



## **Júlia Margarida Raposo Monteiro dos Santos      Selecção de estirpes de leveduras para o rearranque de fermentações amuadas**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Dr.<sup>a</sup> Maria João Sousa, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade do Minho e co-orientação da Dr.<sup>a</sup> Sónia Mendo, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Este trabalho foi desenvolvido ao abrigo do projecto PARFERM – Paragens de Fermentação Alcoólicas: causas múltiplas e soluções integradas, financiado pela Agência de Inovação (Adi) no âmbito do programa POCI2010/medida 2.3



Programa Operacional Ciência e Inovação 2010



UNIÃO EUROPEIA  
FEDER

## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares**

professor catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr.<sup>a</sup> Maria Arlete Mendes Faia**

professora catedrática do Departamento de Indústrias Alimentares da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Prof. Dr.<sup>a</sup> Maria Cecília Lemos Pinto Estrela Leão**

professora catedrática da Escola de Ciências de Saúde da Universidade do Minho

**Prof. Dr.<sup>a</sup> Maria João Marques Ferreira Sousa Moreira**

professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade do Minho

**Prof. Dr.<sup>a</sup> Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso**

professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

O trabalho de investigação desenvolvido e apresentado nesta tese foi realizado no Departamento de Biologia da Universidade do Minho. Gostaria de manifestar o meu reconhecimento a todos, que de forma directa ou indirecta contribuíram para a sua realização:

À Professora Doutora Maria João Sousa, pela orientação neste trabalho, pelas críticas e sugestões, assim como por todos os conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e apoio demonstrados.

À Professora Doutora Cecília Leão, pelas críticas e sugestões formuladas durante o desenvolvimento e discussão do trabalho e na revisão do texto.

À Professora Doutora Maria Helena Cardoso, pelos ensinamentos prestados no trabalho experimental, pelas sugestões, conselhos e disponibilidade.

À Professora Doutora Isabel Spencer-Martins, pela colaboração na discussão de resultados, no âmbito do projecto em que se insere a realização do presente trabalho de tese.

À Professora Doutora Sónia Mendo, pela pronta disponibilidade e ajuda prestada, pelos conhecimentos transmitidos durante a parte curricular do mestrado e pela simpatia com que nos recebeu no mestrado.

A todos os meus colegas de mestrado, pela amizade e camaradagem demonstradas. À Ana, Carla, Joana e em especial à Marta e Nuno, pela amizade e principalmente pelos momentos hilariantes e pela constante boa disposição.

A todos os colegas do Departamento de Biologia pela amizade e pelo excelente ambiente de trabalho proporcionado. Aos colegas de laboratório Isabel João, Gabriela, Rui, Sónia, Björn, Sandra, Neide e Rita, pelos bons momentos passados e por todo o apoio e amizade.

À Clara, companheira de bancada, pela amizade, simpatia e paciência demonstradas.

À Patrícia e Susana pela vossa amizade e carinho demonstrados nos bons e maus momentos.

À Tixa, Sandrina e Tatiana pela amizade incondicional ao longo dos anos e apoio constante. Vocês são os meus pilares.

Ao Ruizinho, pelo companheirismo, palavras sábias e por me manter sempre com os pés na terra.

E por fim aos meus pais, pelo apoio e amor incondicionais que sempre demonstraram em todos os meus projectos.

## palavras-chave

Fermentações amuadas, *Saccharomyces cerevisiae*, estirpes vínicas.

## resumo

Tendo como objectivo, do presente trabalho, a selecção de estirpes capazes de relançarem uma fermentação amuada e converterem o açúcar residual em etanol, foram estudadas várias estirpes vínicas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* laboratorial e estirpes não *Saccharomyces*. As estirpes foram caracterizadas no que respeita ao seu perfil de resposta a diferentes condições do meio (presença de etanol e/ou ácido acético e fonte de azoto), normalmente associadas ao atraso e paragem da fermentação vinária. Da avaliação da resposta das estirpes em estudo, quanto à concentração da fonte de azoto, verificou-se que a concentração mínima requerida por estas estirpes para o esgotamento total de açúcar presente no meio, num tempo considerado normal, foi de 267 mg/L de azoto assimilável.

A caracterização da resposta à presença de etanol e ácido acético, por análise da sobrevivência celular, avaliada por contagem de Unidades Formadoras de Colónias (UFC), permitiu verificar que as estirpes *Zygosaccharomyces bailii* e *Torulaspora delbrueckii* foram as mais resistentes, seguidas por duas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*. As estirpes com melhor desempenho foram em seguida testadas na capacidade de consumo de frutose em meio contendo 25 g/l frutose, 12% (v/v) etanol e 0,06% (v/v) ácido acético, que simula o mosto amuado. As estirpes comerciais de *S. cerevisiae* foram as mais eficientes no consumo de frutose, mostrando que não existe uma correlação directa entre perda de viabilidade na presença de etanol e ácido acético e a capacidade de consumir frutose na presença destes agentes de stresse.

Para a selecção das condições de adaptação mais adequadas para um melhor desempenho no mosto simulado, foram efectuadas experiências de adaptações com uma estirpe de *S. cerevisiae*, em diferentes estados fisiológicos com ou sem adaptação prévia ao etanol. Estas experiências demonstraram que uma adaptação prévia apenas melhorou o desempenho em células em fase exponencial de crescimento, verificando-se que os melhores resultados foram obtidos com uma adaptação a concentrações moderadas de etanol durante 2 horas.

## resumo

A capacidade de transporte do açúcar da estirpe de *S. cerevisiae* foi avaliada na presença e na ausência de etanol, e utilizando células nas mesmas fases de crescimento e condições de adaptação usadas nos ensaios de consumo de frutose. Observou-se uma correlação entre consumo de frutose e transporte de glucose na presença e ausência de etanol apenas para células em fase exponencial. Para as células em fase estacionária e em fase exponencial previamente adaptadas a etanol, as diferenças observadas para o transporte de glucose na presença ou ausência de etanol, não se reflectiram nas taxas de consumo de frutose, sugerindo que nestas células outros factores influenciam o consumo de açúcar.

Na tentativa de averiguar se as diferenças de sensibilidade do transporte de glucose encontradas em células provenientes de culturas em diferentes fases de crescimento poderiam estar relacionadas com a expressão de diferentes transportadores foi estudada a inibição do transporte de glucose pelo etanol, em estirpes de *S. cerevisiae* que expressam unicamente um dos transportadores de glucose com relevância fisiológica (Hxt1-Hxt7). Os transportadores de glucose apresentaram diferentes percentagens de inibição do transporte na presença de etanol, tendo os transportadores Hxt4 e Hxt5 demonstrado ainda diferentes graus de inibição consuante a fase de crescimento. Tendo em conta os padrões de expressão descritos para os diferentes transportadores de glucose ao longo de uma curva de crescimento, não foi encontrada uma correlação directa entre a inibição do transporte de glucose pelo etanol observada quando os transportadores de glucose foram expressos individualmente, e as diferenças de inibição do transporte de açúcar encontradas nas células da estirpe comercial de *S. cerevisiae* estudada, em diferentes fases de crescimento.

## keywords

Sluggish fermentations, *Saccharomyces cerevisiae*, wine strains

## abstract

The aim of the present work was the selection of yeast strains capable of re-starting sluggish fermentations and converting the residual fructose to ethanol. To this aim, we first evaluated a group of yeasts comprising commercial wine strains, non-commercial *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces*, by characterizing the response of these strains to different medium conditions (presence of ethanol and/or acetic acid, and nitrogen source) known to contribute to slow down the vinification process. By evaluation of the strain's response to the concentration of the nitrogen source, we observed that the minimal nitrogen concentration required to attain complete dryness of sugar within a reasonable time, was 267 mg/L of assimilable nitrogen. The characterization of the strain's response to the presence of ethanol and acetic acid was evaluated by CFU counts in viability assays, and allowed to verify that the most resistant strains were *Zygosaccharomyces bailii* and *Torulaspora delbrueckii* followed by two of the commercial *S. cerevisiae* strains. The best performing strains were further tested for their capacity to consume fructose in medium containing 25 g/l fructose, 12% (v/v) ethanol and 0,06% (v/v) acetic acid. Commercial *S. cerevisiae* strains were the most efficient, showing that there was no direct correlation between the loss of viability in the presence of ethanol and acetic acid and the capacity to ferment fructose under aggressive conditions. Ethanol adaptation experiences were made using a *S. cerevisiae* strain for the selection of adequate adaptation conditions to improve the performance of this strain in synthetic must. These experiences demonstrated that a previous adaptation to ethanol only improved the performance of exponential growing cells. The best results were obtained with moderate concentrations of ethanol during short times (2 hours) of adaptation.

## abstract

The sugar transport capacity of *S. cerevisiae*, was evaluated in the presence and in the absence of ethanol, using cells in the same growth phase and adaptation conditions as those used in the fructose consumption assays. For *S. cerevisiae* a relation between fructose consumption and glucose transport in the presence or absence of ethanol was observed only in exponential growing cells. For stationary phase cells and adapted cells the differences observed for glucose uptake rates, either in the presence or in the absence of ethanol were not expressed in fructose consumption rates, suggesting that in these cells other factors are influencing sugar consumption. To verify if the differences found in glucose uptake for cells in different growth phases could be related with the expression of different glucose transporters, inhibition of glucose uptake by ethanol was studied in *S. cerevisiae* strains expressing each of the major hexose transporters (*Hxt1-Hxt7*). The individual glucose transporters exhibited different inhibition percentages of transport in the presence of ethanol. The transporters Hxt4 and Hxt5 showed different degrees of inhibition depending on the growth phase. Based on the expression patterns described for the different glucose transporters during a growth curve a direct correlation between glucose transport inhibition of the different transporters in the presence of ethanol and the transport inhibition exhibited by the commercial *S. cerevisiae* strain at different growth phases, was not found.

## **Índice**

	<b>Página</b>
<b>Agradecimentos</b>	
<b>Resumo</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>Capítulo 1 - Introdução geral</b>	<b>1</b>
<b>1.1 A indústria do vinho: situação actual e perspectivas</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Paragens e amuos de fermentação: ocorrências e causas</b>	<b>4</b>
1.2.1 Ocorrências	4
1.2.2 Causas	6
<i>Desequilíbrio nutricional</i>	6
<i>Factores de sobrevivência e défice de oxigénio</i>	7
<i>Temperatura e etanol</i>	8
<i>Ácidos carboxílicos</i>	10
<i>Práticas enológicas</i>	11
<i>Substâncias zimostáticas e zimocidas</i>	12
<b>1.3 Estirpes vínicas</b>	<b>13</b>
1.3.1 Estirpes vínicas <i>Saccharomyces</i>	13
1.3.2 Estirpes vínicas não- <i>Saccharomyces</i>	14
1.3.3 Selecção de estirpes	16
<b>1.4 Transporte de glucose</b>	<b>17</b>
<b>Capítulo 2 - Materiais e métodos</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Microrganismos</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Meios de cultura, condições de crescimento e de fermentação</b>	<b>23</b>

---



2.2.1	Avaliação do crescimento e capacidade fermentativa em função da concentração de azoto assimilável no meio de cultura	23
2.2.2	Avaliação da resistência das estirpes ao etanol e/ou ácido acético, expressa em termos de perda de viabilidade celular	24
2.2.3	Fermentações em ‘mosto amuado simulado’	25
2.2.4	Experiências de adaptação ao etanol	25
2.2.5	Transporte membranar de açúcares	26
2.3	Doseamento de açúcares por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)	26
2.4	Doseamento de açúcares pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS)	27
2.5	Isolamento de colónias <i>petits</i> e de mutantes respiratórios rho <sup>0</sup>	27
2.6	Transporte de glucose	28
 <b>Capítulo 3 - Caracterização de estirpes comerciais vínicas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e estirpes não-<i>Saccharomyces</i> em função da fonte de azoto e da presença de etanol e/ ou ácido acético no meio de cultura</b>		
3.1	Avaliação do crescimento e da capacidade fermentativa em função da concentração de azoto assimilável no meio de cultura	31
3.2	Avaliação da resistência das estirpes ao etanol e/ou ácido acético expressa em termos de perda de viabilidade celular	35
3.2.1	Efeito do ácido acético (2%, v/v) na viabilidade celular a 20 °C e 26 °C	36
3.2.2	Efeito conjugado de ácido acético e etanol na viabilidade celular à temperatura de 20 °C e 26 °C	38
3.2.3	Efeito do ácido acético (2%, v/v) e o efeito combinado de ácido acético (0,6%, v/v) e etanol (18%, v/v) na viabilidade celular de um mutante respiratório da estirpe <i>S. cerevisiae</i> PYCC 5792	43

---

<b>Capítulo 4 - Selecção de estirpes e de condições de adaptação mais adequadas ao rearranque de fermentações amuadas</b>	<b>47</b>
4.1 Comportamento das estirpes de leveduras seleccionadas em ‘mosto amuado simulado’ com 12% (v/v) de etanol, à temperatura de 20 °C	49
4.2 Comportamento em ‘mosto amuado simulado’ com 12% (v/v) de etanol, à temperatura de 20 °C: experiências de adaptação ao etanol	53
<b>Capítulo 5 - Avaliação da influência do transporte membranar de açúcares no perfil de fermentação</b>	<b>57</b>
5.1 Caracterização do transporte membranar de glucose em <i>S. cerevisiae</i>	59
5.2 Efeito do etanol no transporte membranar de glucose em estirpes de <i>S. cerevisiae</i> que expressam unicamente um dos genes <i>HXT1-HXT7</i>	61
<b>Capítulo 6 - Considerações finais</b>	<b>67</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>71</b>

---

---

*Capítulo 1*

**Introdução geral**

---

## 1.1 A indústria do vinho: situação actual e perspectivas

Actualmente, o vinho é um componente integral em várias culturas mundiais, sendo um bem de consumo, para alguns de primeira necessidade, que tem acompanhado a evolução da condição humana, modificando-se consoante os nossos desejos e englobando uma indústria mundial altamente competitiva.

De acordo com as indicações mais recentes da OIV (Organização Internacional do Vinho), a produção comunitária de vinho da campanha de 2001/02 (158,555 milhões de hectolitros) representou cerca de 59,3 % da produção mundial de vinho (267,6 milhões de hectolitros). A França, a Itália e a Espanha foram os três maiores produtores a nível mundial, seguidos pelos Estados Unidos (19,8 milhões de hectolitros, ou 8 %) e pela Argentina (15,835 milhões de hectolitros). A União Europeia foi o principal exportador mundial em 2001, com 12,2 milhões de hectolitros, valor superior aos 11,518 milhões de hectolitros exportados em 2000 e aos 11,552 milhões de hectolitros exportados em 1999. Os principais importadores tradicionais de vinho comunitário foram os Estados Unidos, com 3,253 milhões de hectolitros, a Suíça, com 1,620 milhões de hectolitros, o Canadá, com 1,204 milhões de hectolitros, e o Japão, com 1,188 milhões de hectolitros ([http://europa.eu.int/eur-lex/pt/com/rpt/2003/com2003\\_0852pt01.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pt/com/rpt/2003/com2003_0852pt01.pdf)).

Embora seja o maior produtor e exportador mundial, o consumo de vinho na Europa apresenta uma tendência decrescente há cerca de três décadas, com uma quebra de cerca de 40 a 50% *per capita*, particularmente nos países produtores (Bisson *et al*, 2002). Em paralelo, assiste-se a um aumento mundial do consumo de vinhos de qualidade, beber menos mas melhor, parece ser a norma em todos os países. Este incremento na busca pela qualidade está intimamente ligado à melhoria da qualidade de vida sentida por parte dos consumidores, impondo-se o consumo ocasional, com vinhos de qualidade, ao consumo diário (<http://eurowine.vintagemaster.com/mod/modul-01.html>).

Em 1880, Robert Louis Stevenson empregou o termo “bottled poetry” para descrever a busca pela perfeição dos produtores na arte de fazer vinho. Falar de “qualidade” em qualquer forma de arte é deveras subjectivo e o que satisfaz um consumidor pode desagradar a outro. Esta dualidade de preferências tem acompanhado fielmente a indústria vínica, tornando os produtores conscientes que o estilo desenvolvido por cada um, para diferenciar o seu produto, pode não ser apelativo para todos. É portanto fundamental

compreender os factores fisiológicos, genéticos e ambientais, que suportam estas preferências (Bisson *et al*, 2002).

Nas últimas décadas, a ciência sensorial contribuiu significativamente para o conhecimento das variáveis que influenciam e colaboram na percepção sensorial de alimentos e bebidas. Inicialmente estas análises sensoriais eram usadas, tal como as químicas, como controlo de qualidade, certificando-se da ausência de odores ou sabores indesejados. Com a sequenciação do genoma humano e novos avanços no campo da neurobiologia do comportamento, emergem informações cruciais sobre a definição de qualidade e preferência. Sabe-se hoje que aproximadamente 2% do genoma humano codifica receptores olfactivos e que existe uma íntima ligação entre percepção de um odor e emoções, agradáveis ou não. Usando ferramentas estatísticas de análises variadas bem como redes artificiais neurológicas é possível, actualmente, traçar o perfil gustativo de cada vinho (Bisson *et al*, 2002).

O futuro desta indústria encaminha-se assim para a individualização dos consumidores, com base nas suas diferenças genéticas e nos seus perfis olfactivos, que determinarão decisões de produção e de marketing dos vinhos (Bisson *et al*, 2002).

## **1.2 Paragens e amuos de fermentação: ocorrências e causas**

### **1.2.1 Ocorrências**

Paragens ou amuos de fermentações, persistem hoje na indústria viníca, causando avultadas perdas todos os anos. Segundo um estudo conduzido em França (Association for the Development of Wine Biotechnology, 1996), mais de 60% dos vinicultores inquiridos, já se depararam com este problema. O elevado conteúdo de açúcar residual presente em mostos amuados, aumenta a susceptibilidade destes à deterioração por microrganismos, impedindo assim o seu engarrafamento, devido à sua instabilidade do ponto de vista microbiano (Bisson, 1999).

As fermentações que apresentam um nível de açúcar residual acima do esperado no final da fermentação alcoólica (menos de 0,4% de açúcar residual), são designadas por

fermentações incompletas ou paradas. Por sua vez, as fermentações que requerem mais tempo que o normal (7 a 10 dias) para atingirem um baixo nível de açúcar residual, designam-se por fermentações amuadas e caracterizam-se por um abrandamento no consumo de açúcares, que geralmente é um indicador de condições ambientais ou fisiológicas adversas. Este decréscimo na taxa de consumo de açúcares é consequência da diminuição da capacidade de transporte de açúcares para o interior da célula, e não devido à interrupção da via glicolítica (Bisson, 1999). Uma vez que a livre presença intracelular de glucose e frutose é tóxica para a célula o seu transporte é cuidadosamente coordenado consoante as necessidades celulares, e um decréscimo nesta actividade de transporte actua como um mecanismo de sobrevivência em resposta a condições ambientais ou fisiológicas de stress. Reverter esta resposta adaptativa de sobrevivência de *Saccharomyces cerevisiae* é extremamente difícil sendo a primordial razão pela qual a rectificação de fermentações amuadas ou incompletas é um desafio nem sempre superado (Bisson *et al*, 2000).

As causas desta diminuição no consumo de açúcares que levam às paragens ou amuos são numerosas, difíceis de diagnosticar e podem ser muito variadas, indo desde desequilíbrios nutricionais, presença de substâncias tóxicas no mosto, temperatura e pH extremos, fraca tolerância ao etanol e inibidores naturais, até más práticas enológicas (uso excessivo de SO<sub>2</sub>, falta de agitação, excessiva clarificação do mosto) (Bisson *et al*, 2000). Estes factores podem actuar em sinergia e uma vez combinados podem ser bastante mais inibitórios que cada factor individualmente (Bisson, 1999). Entre as principais causas destacam-se a ausência de azoto assimilável e intolerância ao etanol e ácido acético. A ausência de azoto assimilável numa fermentação é um incidente recorrente na vinificação dos mostos, sendo apenas corrigida numa fase tardia, geralmente insuperável. A necessidade de azoto para a síntese proteica e crescimento por parte das populações de leveduras, faz deste um nutriente essencial (Specht, 2003). Já o etanol e ácido acético, dois produtos finais de fermentações conduzidas por *S. cerevisiae*, podem levar a paragens, devido à sua elevada toxicidade para as células (Bisson *et al*, 1993).

### 1.2.2 Causas

#### *Desequilíbrio nutricional*

Os macronutrientes, cuja ausência ou baixos níveis, causam frequentemente amuos ou paragens de fermentações são o azoto e o fosfato. O conteúdo em azoto dos mostos pode variar desde 60 mg/L a 2400 mg/L dependendo da variedade da uva, região vitícola e processos de produção. O azoto é necessário para o crescimento das populações de leveduras, estimulação da taxa de utilização de açúcares e para a síntese proteica. Níveis iniciais baixos de azoto podem limitar a taxa de crescimento e formação de biomassa (Alexandre *et al.*, 1998), bem como a acumulação de reservas celulares de azoto, nomeadamente em vacúolos (Carrasco *et al.*, 2003; Bisson, 1999). Suplementos de azoto adicionados a uma fermentação durante o período de crescimento das leveduras resultam em produção de biomassa máximas enquanto que se estas adições surgirem em fase estacionária resultam num aumento da taxa específica de fermentação, reduzindo a sua duração, podendo ou não estar associadas a um aumento da população microbiana (Beltran *et al.*, 2005; Mendes-Ferreira *et al.*, 2004). Na fase estacionária, onde a taxa de renovação das proteínas transportadoras é muito elevada, é necessário um suplemento em azoto para a síntese contínua destas (Salmon, 1989). Enquanto a maioria das proteínas metabolicamente importantes são relativamente estáveis ao esfomeamento por azoto, as proteínas transportadoras de glucose são a excepção, manifestando tempos de meia vida de aproximadamente 5 horas em células fermentativas (Henschke *et al.*, 1993). Contudo, nem todas as fontes de azoto presentes no mosto são assimiláveis por *S. cerevisiae*. Certos aminoácidos como a prolina, lisina, cisteína, péptidos com mais de cinco resíduos e proteínas não são utilizados. O ião amónio e o aminoácido glutamato são boas fontes de azoto, entrando directamente nas reservas intracelulares de biosíntese de precursores, sendo o primeiro geralmente administrado a fermentações sob a forma de fosfato de diamónio (DAP) como suplemento nutricional (Henschke *et al.*, 1993; Specht, 2003).

O fosfato é indispensável à manutenção das reservas celulares de fosfato inorgânico (Pi), ADP e ATP e consequentemente à regulação da via glicolítica. Limitações deste nutriente perturbam o crescimento celular, o rendimento em biomassa e afectam a taxa de fermentação (Gancedo e Serrano, 1989).

Deficiência de minerais e catiões no mosto pode resultar em reduções na taxa de fermentação, visto que estes servem como cofactores em reacções enzimáticas glicolíticas e outras. Limitações de minerais como o zinco e magnésio afectam directamente o catabolismo de açúcares, enquanto que défices de cálcio aumentam a sensibilidade ao etanol (Bisson, 1999).

Todas as vitaminas essenciais, excepto a biotina, são sintetizadas por *S. cerevisiae*, o que não impede que ocorram amuos de fermentação devido à insuficiência das mesmas. Certas vitaminas, como a tiamina, são esgotadas em questão de horas do mosto por espécies indígenas, criando um défice que poderá resultar em amuos ou paragens de fermentação. Também a presença de ácido acético, através da redução do transporte de tiamina por *S. cerevisiae* bem como o dióxido de enxofre através da sua reacção com a mesma pode levar a uma situação deficitária desta vitamina (Bisson, 1999; Alexandre *et al.*, 1998).

### ***Factores de sobrevivência e défice de oxigénio***

Os lípidos são componentes maioritários da membrana celular das leveduras. São necessários para a gemulação e crescimento das leveduras na fase inicial de uma fermentação, e para a protecção das células contra a toxicidade do etanol em fases tardias. Na fase anaeróbica de crescimento, cada ciclo de gemulação leva a um decréscimo de 50% da quantidade de lípidos presentes na célula. A carência de lípidos impede o funcionamento correcto da membrana, afectando o equilíbrio osmótico de nutrientes (Specht, 2003). A biosíntese destes lípidos (ácidos gordos e esteróis) é dependente da presença de oxigénio, e a sua privação, durante a fermentação de mostos, provoca alterações qualitativas e quantitativas na composição lipídica da célula (Ratledge e Evans, 1989). A enzima dessaturase da síntese dos ácidos gordos e a esqualeno oxidase da síntese dos esteróis, ambas necessitam de oxigénio como aceitador de electrões para a sua actividade. Assim, um défice em oxigénio pode levar a amuos de fermentação, devido à inibição da biosíntese de lípidos com consequente decréscimo do conteúdo em ergosterol e



ácidos gordos insaturados, resultando numa diminuição da produção de biomassa e viabilidade celular (Bisson, 1999).

Como prevenção destes efeitos adversos, os vinicultores arejam os mostos geralmente no final do crescimento celular (Alexandre *et al.*, 1998). Estudos comprovaram que a adição de ergosterol e ácidos gordos nas etapas intermédias da fermentação melhora substancialmente a sobrevivência celular, enquanto que a adição na fase inicial não estimula o crescimento das leveduras, daí resultando o nome “factores de sobrevivência” (Reed *et al.*, 1988).

### ***Temperatura e etanol***

A temperatura tem um papel determinante durante a multiplicação celular no início do processo fermentativo. Uma rápida multiplicação implica uma capacidade de produção de etanol mais rápida do que a capacidade de efluxo, resultando numa acumulação de etanol no interior da célula. Este excesso de etanol intracelular vai afectar e limitar a resistência celular à toxicidade do etanol em fases avançadas da fermentação, conduzindo a fermentações incompletas ou amuadas (Specht, 2003). A exposição a extremos de temperatura provoca a morte dos microrganismos, normalmente designada por “Morte Térmica”. A dependência do crescimento e da morte celular com a temperatura foi alvo de estudos sistematizados por van Uden e colaboradores (van Uden *et al.*, 1968; van Uden e Madeira-Lopes, 1970; van Uden e Vidal-Leiria, 1976; van Uden, 1984-a e b). A temperatura também afecta a taxa de fermentação, a fluidez da membrana e os transportadores membranares (Leão e van Uden, 1982, 1985). Mediante baixas temperaturas a fluidez é reduzida e as alterações conformacionais dos transportadores são restringidas. Na presença de temperaturas elevadas a fluidez aumenta e a estrutura dos transportadores sofre alterações conformacionais (Bisson, 1999). O etanol e a temperatura actuam sobre os mesmos alvos, apresentando efeitos sinérgicos sobre o comportamento das leveduras (Leão e van Uden, 1982, 1985; Sá-Correia e Van Uden, 1983). Sá-Correia e van Uden verificaram através do estudo dos perfis de temperaturas de crescimento em função da concentração de etanol, que este

efeito sinérgico é máximo para temperaturas acima dos 20 °C e temperaturas abaixo dos 15 °C (Sá-Correia e Van Uden, 1983).

A toxicidade do etanol está frequentemente associado a paragens ou amuos de fermentação. Vários mecanismos contribuem para a inibição do crescimento e da fementação pelo etanol.

Um dos principais alvos dos efeitos do etanol é a membrana plasmática, na qual provoca alterações à sua fluidez, resultando na alteração da permeabilidade da membrana a espécies iónicas, especialmente protões (Leão e van Uden, 1984-a; Cartwright *et al.*, 1986). Este aumento no influxo de protões resulta na dissipação do gradiente electroquímico da membrana que, por sua vez, poderá conduzir à acidificação intracelular (Loureiro-Dias e Santos, 1990). Contudo, foi proposto que o aumento do fluxo passivo de protões pode não ser a principal causa de toxicidade do etanol, uma vez que em experiências onde o etanol foi adicionado a culturas em crescimento, a morte celular ocorre antes da alteração do pH intracelular (Rosa e Sá-Correia, 1996). Em contrapartida, o etanol parece activar a ATPase, responsável pela manutenção do gradiente electroquímico, através da membrana plasmática (Rosa e Sá-Correia, 1991). Este mecanismo de adaptação poderá resultar da tentativa de neutralizar a crescente acidificação citoplasmática induzida aquando da exposição ao etanol (Alexandre *et al.*, 2001; 1998). Tem sido proposto que o etanol interage com a membrana, possivelmente por alojamento no seu interior hidrofóbico, aumentando a polaridade desta região e assim permitindo a livre troca de moléculas polares e contribuindo para o enfraquecimento das interacções hidrofóbicas (Alexandre *et al.*, 1998). O etanol induz o aumento dos níveis de ácidos gordos insaturados (principalmente ácido oleico) e ergosterol na membrana plasmática, resultando numa maior fluidez e elevando assim a tolerância ao etanol (Alexandre *et al.*, 1994, 1998; You *et al.*, 2003). Alternativamente, foi também proposto que o etanol pode afectar a função membranar por interacções polares, dieléctricas e pontes de hidrogénio, com os grupos das cabeças polares dos fosfolípidos e proteínas membranares e não por alteração da fluidez da membrana. Segundo estes autores as alterações sofridas pela membrana resultam da resposta aos efeitos perturbadores do etanol sobre estes alvos (Bisson, 1999).

Em *S. cerevisiae* o etanol mostrou ter efeito inibitório sobre a permease de aminoácidos (Leão e van Uden, 1984-b), o sistema de transporte da glucose (Leão e van Uden, 1982, 1983-a) e o sistema de transporte de amónio (Leão e van Uden, 1983-b). O etanol inibe a

fermentação e crescimento em glucose, afectando a capacidade do sistema de transporte de uma forma não competitiva, sem contudo alterar a sua afinidade para a glucose (Leão e van Uden, 1982). A inactivação, por etanol, do transporte de glucose apresenta diversos padrões dependendo do sistema de transporte, de alta ou baixa afinidade, em estudo (Alexandre *et al.*, 1998). Efeitos negativos na actividade das enzimas chave da via glicolítica, são igualmente referidos na literatura (Scopes, 1989).

### ***Ácidos Carboxílicos***

Ácidos gordos de cadeia média e ácidos orgânicos são também apontados como possíveis responsáveis por paragens ou amuos de fermentações. Estes compostos podem ser produzidos por bactérias, leveduras não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* (Bisson, 1999).

Os ácidos gordos de cadeia média excretados para o mosto durante a fermentação alcoólica, por *S. cerevisiae*, são intermediários na biosíntese de ácidos gordos de cadeia longa e a quantidade libertada no meio de fermentação é dependente da estirpe, composição do meio e condições de fermentação (Alexandre *et al.*, 1998). Estes ácidos gordos, nomeadamente os ácidos octanoico e decanoico, manifestam propriedades antimicrobianas, inibindo exponencialmente a taxa específica de crescimento de *S. cerevisiae*, em função da sua concentração (Viegas *et al.*, 1989). A toxicidade associada aos ácidos gordos é dependente do pH do meio, aumentando quando o pH baixa, o que indica que a forma não dissociada é a mais tóxica (Viegas *et al.*, 1989). Os ácidos octanoico e decanoico, inibem igualmente o transporte de glucose sendo o sistema de transporte de alta afinidade mais sensível que o transporte de baixa afinidade. Este estudo parece indicar que o efeito inibitório de ácidos gordos de cadeia média, no transporte de alta afinidade de glucose, pode ser responsável por paragens ou amuos de fermentação, tendo em conta que numa fase tardia na fermentação é o sistema de transporte de alta afinidade, o principal responsável pela entrada de glucose nas células (Alexandre *et al.*, 1998).

O ácido acético, um produto secundário da fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*, tem um papel determinante no balanço organoléptico dos vinhos, sendo o componente principal da acidez volátil (Guldfeldt e Arneborg, 1998). Nos vinhos é indesejável a presença de

ácido acético acima de 0,8 g/L. Contudo, níveis superiores podem ser produzidos dependendo da estirpe, composição do mosto e processo de vinificação, afectando substancialmente a qualidade do vinho (Remize *et al.*, 2000). A produção de ácido acético não é exclusiva de *S. cerevisiae*, contribuindo também para a sua produção bactérias ácido-lácticas e acéticas contaminantes. (Casal *et al.*, 1998). O ácido acético, proveniente do metabolismo de bactérias, é apontado como sendo um agente causador de paragens ou amuos de fermentações, uma vez que estes microrganismos produzem quantidades consideradas inibitórias para as leveduras fermentativas, que por si só, não produzem quantidades significativas deste composto (Edwards *et al.*, 1999).

Em *S. cerevisiae*, quando o crescimento ocorre em meio de cultura com glucose, o ácido acético entra na célula através da membrana plasmática, por difusão simples da forma não dissociada, e dissocia-se no seu interior, acumulando-se em função da diferença de pH. Este mecanismo resulta numa acidificação intracelular e acumulação de aniões com consequente inibição da actividade metabólica celular (Pampulha e Loureiro-Dias, 1989, 1990; Pampulha e Loureiro, 1989; Ludovico *et al.*, 2001).

### ***Práticas enológicas***

Certas práticas enológicas podem conduzir a paragens ou amuos de fermentações. A matéria prima da produção de vinho, o mosto, sofre clarificação, no caso dos vinhos brancos. Uma clarificação excessiva reduz a taxa de fermentação e a produção de biomassa devido à perda de nutrientes, tais como ácidos gordos insaturados e esteróis, e redução do conteúdo mineral e vitamínico (Bisson, 1999).

Também o uso excessivo de dióxido de enxofre, como agente antimicrobiano e antioxidante, pode resultar numa baixa capacidade fermentativa dependendo do pH do meio e da concentração do dióxido de enxofre. A valores de pH baixos, este encontra-se predominantemente na forma molecular  $\text{SO}_2$ , já a valores mais elevados encontra-se sob forma de iões sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) sendo a forma molecular  $\text{SO}_2$  mais activa em leveduras cerca de quinhentas vezes do que as outras formas de sulfitos ( $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ). A sua adição geralmente antecede a fermentação alcoólica de maneira a controlar o crescimento de

espécies indesejáveis. A toxicidade deste composto para *S. cerevisiae* é dependente da sua acumulação na célula, onde se dissocia no anião bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) e em  $\text{H}^+$  devido ao pH intracelular ser mais elevado, permitindo assim a contínua difusão para o interior celular (Alexandre *et al.*, 1998). Aqui, o bissulfito induz um rápido decréscimo nos níveis intracelulares de ATP, reage com proteínas, coenzimas e metabolitos, cliva tiamina e as pontes de dissulfureto de proteínas, conduzindo à morte celular (Hinze e Holzer, 1986).

### ***Substâncias zimostáticas e zimocidas***

Algumas substâncias tóxicas produzidas por leveduras, vulgarmente conhecidos como factores “killer”, podem inibir a fermentação vínica levada a cabo por leveduras sensíveis (Medina *et al.*, 1997). Leveduras não-*Saccharomyces* como *Hansenula* e *Kluyveromyces* e leveduras do género *Saccharomyces* são responsáveis pela produção destes factores “killer” que são activos contra estirpes sensíveis. O seu efeito está dependente da composição do meio e da razão entre estirpes sensíveis e estirpes produtoras das substâncias zimocidas. Outros microrganismos, como bactérias, também produzem substâncias tóxicas para *Saccharomyces*, como a siringomicina produzida por *Pseudomonas* ou metabolitos produzidos por *Bacillus* e *Streptomyces*. As últimas são frequentemente encontradas como contaminantes em adegas produtoras de vinho (Bisson, 1999).

Outras substâncias com capacidade inibitória para a fermentação poderão ser as micotoxinas produzidas por bolores presentes em uvas após a colheita (Bisson, 1999). As principais doenças desencadeadas por estes fungos filamentosos nas vinhas são o oídio, o míldio, a podridão cinzenta ou botritis ([www.amap.pt/artigomaio.htm](http://www.amap.pt/artigomaio.htm)). Contudo, a sensibilidade a estas micotoxinas pode ser dependente da composição do meio, uma vez que o género *Saccharomyces* é em geral resistente a estas substâncias, não tendo sido comprovada uma correlação directa entre a presença de micotoxinas e paragens ou amuos das fermentações testadas (Bisson, 1999). Sabe-se todavia, que mostos provenientes de uvas infectadas com *Botrytis cinerea* normalmente fermentam mais devagar, apresentado uma formação mais elevada de glicerol e ácido acético e favorecem a presença de certas leveduras como

*Kloeckera apiculata* e *Torulopsis stellata* (Donèche, 1993). Para além da produção de micotoxinas, estes fungos desencadeiam a produção de compostos tóxicos, por parte da planta infectada. Estes compostos, com destaque para as fitoalexinas, chitanases e glucanases, com acção tóxica sobre a parede dos fungos infecciosos, podem também afectar o crescimento e fermentação das leveduras pois estas pertencem à mesma família taxonómica dos fungos e apresentam similaridades na arquitectura da parede celular (Bisson, 1999).

Fungicidas e pesticidas, quando presentes em concentrações residuais altas, podem afectar a viabilidade celular (Ribeiro *et al.*, 2000) resultando em fermentações amuadas ou incompletas. A sua acção passa pelo aumento da fase de latência e a alta concentração de iões pesados e sais de sódio presentes nestes produtos, pode inibir o crescimento e a fermentação (Bisson, 1999; Specht, 2003).

## 1.3 Estirpes vínicas de leveduras

### 1.3.1 Estirpes vínicas *Saccharomyces*

Estirpes do género *Saccharomyces* são vulgarmente encontradas na natureza na superfície das uvas, podendo também ser isoladas de frutos em estado de apodrecimento. São também encontradas nas adegas como parte integrante da bioflora destes locais. Estudos comprovam que a bioflora das adegas domina a fermentação de mostos em detrimento das estirpes encontradas nas vinhas (Mortimer e Polsinelli, 1999). Os isolados indígenas de *Saccharomyces* são tipicamente diploides homotáticos (Puig *et al.*, 2000) possuindo a capacidade de mudar de *mating type* e assim possibilitar o cruzamento entre célula mãe e célula filha. Esta capacidade de alternância entre *mating type* é conferida pelo gene *HO* que codifica uma endonuclease específica necessária à alteração da informação no locus do *mating type*. Ao contrário das estirpes laboratoriais que são geneticamente estáveis, os isolados de estirpes indígenas acumulam mutações durante o crescimento normal, apresentando taxas mais elevadas de mutações espontâneas (Bisson, 2004). A análise de um único isolado indicou a existência de mutações que afectam processos regulatórios

globais e a consequente análise do transcriptoma indica que aproximadamente 6% dos genes de esporos obtidos a partir do isolado original apresentam diferenças nos padrões de expressão (Cavalieri *et al.*, 2000). As estirpes industriais, por seu lado, são também geralmente homotáticas mas podem conter aneuploidias múltiplas, podendo ser monossômicas ou trissômicas para alguns cromossomas. Estirpes industriais são consideradas estirpes cultivadas em condições comerciais para gerar inóculos de levedura desidratada. Estas estirpes têm de ser capazes de manter a viabilidade durante o processo de desidratação/rehidratação (Bisson, 2004). As condições nas quais as estirpes industriais são produzidas poderão ser responsáveis pela variação genómica obtida. Esta diversidade genética limita a eficiência da esporulação e a viabilidade dos esporos impondo desafios à manipulação genética destas estirpes (Johnston *et al.*, 2000).

As estirpes industriais têm surgido após a caracterização fisiológica de isolados indígenas. Os bons candidatos destacam-se pela sua adequação aos processos de produção industrial de levedura e pelos seus atributos na produção do vinho como a tolerância ao etanol e dióxido de enxofre, fermentação completa de açúcares, ausência de produção de compostos deteriorantes, capacidade para ultrapassar condições adversas de fermentação e tolerância a outros microrganismos. Os preparados comerciais não são necessariamente compostos por uma única estirpe. Esta variação pode ocorrer devido a rearranjos genómicos espontâneos durante a produção da estirpe ou ser deliberadamente uma mistura de estirpes diferentes que asseguram uma fermentação completa e aumentam a complexidade de caracteres produzidos pelas leveduras durante a fermentação (Bisson, 2004).

### 1.3.2 Estirpes vínicas não-*Saccharomyces*

Os sabores e aromas de vinhos comerciais são fruto da uva em si e das actividades biológicas levadas a cabo pelos microrganismos presentes. Várias espécies de leveduras e bactérias, e em alguns casos fungos filamentosos, podem estar presentes durante a fermentação do mosto, sendo responsáveis pelas características finais do vinho (Rainieri e Pretorius, 2000). Para além do género *Saccharomyces*, outros são normalmente encontrados

como: *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Kluveromyces* e *Pichia*. A presença e persistência destes géneros não-*Saccharomyces* são condicionadas por vários factores tais como a temperatura de fermentação, adição de nutrientes, arejamento, contacto com pele da uva, natureza da estirpe de *Saccharomyces* usada e práticas de inoculação. Outras leveduras importantes na produção de vinho são as leveduras responsáveis pela deterioração. Nesta categoria incluem-se os géneros *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, e algumas espécies de *Candida* e *Pichia* (Bisson, 2004).

Estas leveduras não-*Saccharomyces*, que para além dos géneros acima referidos podem ainda incluir *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schizosaccharomyces* e *Torulaspora*, encontram-se presentes na fase inicial das fermentações, mantendo-se em crescimento durante vários dias até a fermentação ser dominada por uma ou mais estirpes de *S. cerevisiae* (Mills *et al.*, 2002; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998). Durante esta primeira fase da fermentação estas leveduras com baixo rendimento fermentativo produzem altas concentrações de ésteres, álcoois de cadeia longa, aldeídos e gliceróis que se mostraram importantes para as características organolépticas do vinho (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998). Contudo, na indústria vínica moderna e particularmente na produção em larga escala a fermentação espontânea é pouco viável devido à falta de consistência na reprodutibilidade da qualidade dos vinhos. Recorre-se então ao uso de culturas de arranque de *S. cerevisiae*, para um melhor controlo do processo fermentativo. Esta prática tem resultado em vinhos mais uniformes sem a típica contribuição em aromas e sabores provenientes de uma flora de leveduras indígena. Na tentativa de alterar este panorama, leveduras não-*Saccharomyces* têm recentemente vindo a ser usadas na produção comercial de vinho, nomeadamente em países como os Estados Unidos e Austrália. Esta prática representa uma boa alternativa à problemática que pode advir das fermentações espontâneas, sem contudo comprometer o perfil sensorial do vinho. Devido à baixa tolerância demonstrada por estas leveduras não-*Saccharomyces* ao etanol, é necessária a sua inoculação em conjunto com uma estirpe mais tolerante que assegure a conclusão da fermentação, recorrendo-se geralmente a culturas *starter* mistas ou a inoculações sequenciais (Rainieri e Pretorius, 2000). Foram já testadas culturas *starter* mistas de *Torulaspora delbrueckii* ou *Kluveromyces thermotolerans* em conjunto com *S. cerevisiae* com resultados animadores no que diz respeito ao aroma e sabor obtidos (Sommer *et al.*, 2003).



### 1.3.3 Selecção de estirpes vínicas

A selecção de estirpes para a produção de vinho baseia-se na identificação de culturas que fermentem eficientemente os mostos e produzam vinhos de boa qualidade. Esta selecção é geralmente feita dentro do género *Saccharomyces* e em ambientes vínicos, nomeadamente em adegas, que favorecem o crescimento de estirpes melhor adaptadas ao ambiente enológico (Pretorius, 2000; Rainieri e Pretorius, 2000). Após o isolamento das estirpes segue-se a caracterização das propriedades enológicas (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2000) que se dividem em tecnológicas e qualitativas. As características tecnológicas influenciam a eficiência do processo fermentativo enquanto as características qualitativas dizem respeito à composição química e influenciam as propriedades sensoriais dos vinhos (Rainieri e Pretorius, 2000). Estas características, sumariadas na Tabela 1, podem ser avaliadas através da monitorização do progresso da fermentação e através da determinação por análise química da concentração de compostos presentes no final da fermentação (Schuller e Casal, 2005).

A improbabilidade de encontrar estirpes de *S. cerevisiae* que possuam uma combinação ideal destas características enológicas levou ao alargamento da selecção de estirpes a ambientes não enológicos e a estirpes não-*Saccharomyces* (Rainieri e Pretorius, 2000; Schuller e Casal, 2005). Como acima referido, estas estirpes não são competitivas sob condições enológicas quando comparadas com *S. cerevisiae*, contudo possuem características distintas que influenciam positivamente o perfil sensorial dos vinhos. Estirpes de *S. cerevisiae* isoladas a partir do soro de queijo parmesão degradam o ácido málico presente nos mostos, conseguindo diminuir até 50% a concentração inicial do ácido (Rainieri *et al.*, 1998). Também *Schizosaccharomyces pombe* mostrou ser eficaz na desacidificação de mostos através do consumo de ácido málico (Sousa *et al.*, 1991, 1993; Taillandier *et al.*, 1988-b). *Candida stellata* e *Kloeckera apiculata* produzem elevadas quantidades de glicerol (Ciani e Maccarelli, 1998) e *Candida colliculosa* por seu lado, produz acetaldeído e n-propanol (Rainieri e Pretorius, 2000). Estas características positivas podem assim contribuir para a composição sensorial de vinhos e serem aproveitadas na sua produção.

**Tabela 1.1** – Características enológicas consideradas na selecção de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*

<b>Características enológicas</b>	
<b>Tecnológicas</b>	<b>Qualitativas</b>
<b>Vigor fermentativo</b>	<b>Produtos secundários da fermentação</b>
<b>Tolerância ao etanol</b>	- Glicerol
<b>Resistência ao SO<sub>2</sub></b>	- Ácido succínico
<b>Tipo de crescimento em meio líquido</b>	- Ácido acético
- Células dispersas	- Acetaldeído
- Células agregadas	- n-Propanol
- Flocculação	- Iso-butanol
- Formação de espuma	- Álcool isoamilico
- Formação de biofilme	<b>Produção de compostos de enxofre</b>
- Velocidade de sedimentação	- Dióxido de enxofre
<b>Crescimento a baixas e altas temperaturas</b>	- Ácido sulfídrico
<b>Presença de factores “killer”</b>	<b>Produção ou degradação do Ácido málico</b>

## 1.4 Transporte de glucose em *Saccharomyces cerevisiae*

Durante a fermentação vínica, *S. cerevisiae* converte elevadas quantidades de hexoses, glucose e frutose, presentes no mosto em etanol e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O transporte de hexoses através da membrana plasmática é assim o primeiro passo no metabolismo destes açúcares (Perez *et al.*, 2004). O transporte de glucose é extremamente regulado devido ao elevado potencial tóxico que este açúcar apresenta no interior da célula. Assim, uma diminuição no consumo de açúcares está relacionada com a redução da capacidade de transporte enquanto a restante via glicolítica permanece intacta e activa, representando esta regulação um importante mecanismo de sobrevivência (Bisson, 1999).

Na levedura *S. cerevisiae* as hexoses são transportadas por difusão facilitada, através de transportadores de hexoses, designados por Hxt (*Hexose transporter*). Estas proteínas transportadoras pertencem à superfamília de facilitadores de monossacarídeos e exibem 12 domínios transmembranares bem como sequências conservadas (Bisson, 1999; Elbing *et al.*, 2004). Esta família de transportadores inclui as proteínas Hxt1 até Hxt17, Gal2 e também

Snf3 e Rgt2 que actuam como sensores de glucose, regulando a expressão de genes *HXT*. Em condições laboratoriais os transportadores Hxt1p-Hxt4p, Hxt6p e Hxt7p provaram ser os mais importantes, transportando glucose, frutose e manose, verificando-se a supressão do transporte de glucose em caso de interrupção dos respectivos genes (Reifenberger *et al.*, 1997; Luyten *et al.*, 2002). Contudo, a supressão completa do transporte de hexoses só é conseguida com a interrupção, para além de todos os genes *HXT* (*HXT1-HXT17*), do gene que codifica para a permease de galactose, *GAL2*, e dos genes que codificam para os transportadores de maltose, *AGT1*, *YDL247w/MPH2* e *YJR160c/MPH3*, uma vez que estes transportadores, quando a sua produção está aumentada, apresentam capacidade de transporte de pelo menos uma das várias hexoses (Elbing *et al.*, 2004; Luyten *et al.*, 2002).

Os vários transportadores de glucose apresentam diferenças na sua afinidade e especificidade para com o substrato. Os transportadores Hxt1p e Hxt3p são de baixa afinidade exibindo valores de  $K_m$  de 100 e 30-60 mM, respectivamente. Hxt6p e Hxt7p são transportadores de alta afinidade com valores de  $K_m$  que se situam entre 1 e 2 mM, e Hxt2p e Hxt4p são transportadores de moderada afinidade apresentando um  $K_m$  de aproximadamente 10 mM. Foi porém observado que o transportador Hxt2p, quando expresso em células cultivadas em baixas concentrações de glucose, pode exibir uma componente de baixa e uma de alta afinidade, sugerindo que as condições do meio podem modificar a cinética do transporte mediado por esta proteína (Perez *et al.*, 2004; Reifenberger *et al.*, 1997).

Um dos factores que regula a expressão dos genes *HXT* é a própria glucose. Esta regulação é feita por indução ou repressão ao nível da transcrição, em que genes regulados por indução pela glucose não são expressos na sua ausência e genes regulados por repressão pela glucose não são expressos na presença de altas concentrações, sofrendo desrepressão à medida que a glucose é consumida (Bisson, 1999). Esta regulação na expressão dos transportadores em função da concentração de glucose envolve 3 componentes da via de indução: i) as proteínas membranares Snf3 e Rgt2, que actuam como sensores de glucose extracelular, gerando um sinal intracelular para a indução da expressão dos genes *HXT*, ii) a proteína Rgt1, que actua como repressor, ligando-se aos promotores dos genes *HXT*, impedindo assim a sua transcrição na ausência de glucose, e activando no entanto a transcrição do gene *HXT1* na presença de concentrações altas de glucose e iii) a proteína Grr1, que regula o repressor Rgt1 em função da glucose. Estudos

em mutantes interrompidos nos genes *hxt* ( $\Delta hxt1-7$ ) demonstram que a regulação dos transportadores pela glucose está intimamente correlacionada com a função individual dos mesmos, sendo que a expressão de *HXT1* só é induzida por altas concentrações de glucose, o que está em concordância com a baixa afinidade ( $K_m = 100$  mM) exibida por este transportador. No caso do gene *HXT3* a sua expressão é induzida tanto por altas como por baixas concentrações de glucose, o que está de acordo com a afinidade intermédia do transportador ( $K_m$  entre 30 e 60 mM). Para os genes *HXT2*, *HXT6* e *HXT7* a expressão é induzida apenas por baixas concentrações de glucose, sugerindo que estão associados a transportadores de alta afinidade. No entanto, só os transportadores Hxt6p e Hxt7p são de alta afinidade enquanto que o transportador Hxt2p apresenta uma cinética bifásica. No caso da expressão do gene *HXT4* não se observa correlação entre regulação da transcrição e função, uma vez que é induzido apenas por baixas concentrações de glucose mas exibe uma cinética de transporte de afinidade intermédia. Um possível envolvimento do gene *HXT4* na regulação da expressão de outros genes *HXT*, presentes no mutante *hxt* poderá explicar a cinética encontrada para o transportador em causa (Ozcan e Johnston, 1999).

Estes estudos de cinética do transporte de glucose mediado pelos vários transportadores individuais podem não reflectir a sua função *in vivo* pois foram efectuados em mutantes *hxt*, o que suprime quaisquer interacções possíveis entre os transportadores (Ozcan e Johnston, 1999).

Em estudos recentes foram analisados os padrões de expressão dos principais transportadores de glucose, utilizando uma estirpe, *S. cerevisiae* V5, derivada de uma estirpe vínica industrial e em condições enológicas. Nas mesmas condições, foi também estudado o papel desempenhado por estes transportadores na condução de uma fermentação alcoólica, utilizando estirpes construídas a partir da estirpe *S. cerevisiae* V5 e que expressam os genes *HXT1-HXT7* individualmente. Verificou-se que o transportador de baixa afinidade Hxt1p, em *S. cerevisiae* V5, se encontrava expresso apenas no início da fermentação quando expresso individualmente e demonstrou uma elevada capacidade fermentativa na fase inicial de crescimento, que decresceu na fase estacionária. A expressão do transportador Hxt3p por seu lado, teve início durante o decurso da fermentação atingindo o seu pico máximo no final da fase exponencial de crescimento. Quando expresso individualmente, este transportador apresentou um perfil fermentativo quase normal em comparação com a estirpe selvagem, requerendo no entanto, um período

adicional para completar a fermentação. A expressão dos transportadores de alta afinidade Hxt6p e Hxt7p foi detectável a partir do início da fase estacionária, na presença de concentrações de açúcares anteriormente consideradas repressoras, persistindo até ao final da fermentação. Em contrapartida, o transportador Hxt2p só foi expresso durante a fase de latência, a sua expressão cessando com o início da fase exponencial de crescimento. Sugere-se, neste trabalho, que este transportador influencia o início do crescimento numa fermentação, podendo influenciar a duração da fase de latência (Luyten *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2004).



---

*Capítulo 2*

**Materiais e métodos**

---

## 2.1 Microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas diversas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, das quais: quatro estirpes vnicas comerciais, PYCC 5792, PYCC 5793, PYCC 5794 e PYCC 5795; duas estirpes laboratoriais, PYCC 4072 e Bio-PF. Foram também utilizados mutantes respiratórios obtidos no decurso deste trabalho, a partir das estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5792 e *S. cerevisiae* PYCC 5793, designados por *S. cerevisiae* PYCC 5792 rho<sup>0</sup> e *S. cerevisiae* PYCC 5793 rho<sup>0</sup>, respectivamente. Foram ainda utilizados mutantes de *S. cerevisiae* que expressam unicamente um dos transportadores de glucose com relevância fisiológica (Hxt1-Hxt7), construídos a partir da estirpe parental *S. cerevisiae* MC996A (*MATa ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 MAL2 SUC2 GAL MEL*) e *S. cerevisiae* MC996B (*MATa ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 MAL2 SUC2 GAL MEL*): estirpe RE601A HXT1<sup>+</sup>, estirpe RE602B HXT2<sup>+</sup>, estirpe RE603A HXT3<sup>+</sup>, estirpe RE604A HXT4<sup>+</sup>, estirpe RE605 HXT5<sup>+</sup>, estirpe RE606A HXT6<sup>+</sup>, estirpe RE607A HXT7<sup>+</sup> (cedidos pelo Prof. Eckhard Boles, Reifenberg *et al.*, 1995).

Foram também utilizadas as estirpes *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307 e *Torulaspora delbrueckii* PYCC 5321 e PYCC 5323.

Todas as estirpes foram conservadas em meio de manutenção YPDA constituído por extracto de levedura (0,5%, p/v), peptona (1,0%, p/v), glucose (2,0%, p/v) e agar (2,0%, p/v).

## 2.2 Meios de cultura, condições de crescimento e de fermentação

### 2.2.1 Avaliação do crescimento e capacidade fermentativa em função da concentração de azoto assimilável no meio de cultura

Nestes ensaios, utilizaram-se as estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5792, PYCC 5793, PYCC 5794, PYCC 5795 e PYCC 4072. As estirpes foram cultivadas em meio de cultura líquido previamente filtrado (ver anexo 1), com concentrações crescentes de azoto assimilável (66 mg/L, 150 mg/L, 267mg/L e 402,5 mg/L) em balões Erlenmeyer de 500 ml



contendo 300 ml do respectivo meio para monitorização da fermentação através do consumo de açúcares e em balões Erlenmeyer de 300 ml contendo 150 ml do respectivo meio para monitorização da fermentação através da perda de peso (libertação de CO<sub>2</sub>). As culturas foram incubadas a 20 °C, numa incubadora orbital a 120 rpm.

### **2.2.2 Avaliação da resistência das estirpes ao etanol e/ou ácido acético, expressa em termos de perda de viabilidade celular**

Nos ensaios de viabilidade celular, realizados com o objectivo de caracterizar as estirpes no que respeita à sua resistência ao etanol e/ou ácido acético, foi analisada a capacidade de sobrevivência celular, avaliada por contagem de Unidades Formadoras de Colónias (UFC). Para tal, foi preparado um pré-inóculo, por crescimento durante a noite, a 26 °C e 140 rpm, em 50 ml de meio YPD, constituído por extracto de levedura (0,5%, p/v), peptona (1,0%, p/v) e glucose (2,0%, p/v), previamente autoclavado, até a cultura atingir um valor de D.O.<sub>640 nm</sub> de aproximadamente 0,4. Procedeu-se, em seguida, a uma diluição de 1/3 do pré-inóculo, por adição de 2,5 ml de cultura a 5 ml de meio YPD. Os ensaios de viabilidade celular foram realizados em tubos de vidro com 3 cm de diâmetro, com agitação por magneto, colocados em banhos termoestatizados a 20 ou 26 °C. A cada um dos tubos, contendo 15 ml de meio YPD e etanol e/ou ácido acético às concentrações desejadas, foram adicionados 15 µl da cultura diluída. As concentrações de etanol e/ou ácido acético utilizadas nos ensaios foram: etanol (10, 14 ou 18%, v/v) e ácido acético (0,6%, v/v); etanol (18%, v/v) e ácido acético (0,06%, v/v); ácido acético (2%, v/v). O pH dos meios foi ajustado a 3,7 em todos os ensaios. Foram retiradas amostras (100 µl) a diferentes tempos e plaqueadas, em duplicado, em placas de YPDA com a seguinte composição: extracto de levedura (0,5%, p/v), peptona (1,0%, p/v), glucose (2,0%, p/v) e agar (2,0%, p/v). As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 horas ou até as colónias estarem suficientemente crescidas.

### 2.2.3 Fermentações em ‘mosto amuado simulado’

Nestes ensaios utilizou-se um pré-inóculo de 50 ml obtido por cultura das células em meio YPD, durante a noite, a 26 °C e 140 rpm, até um valor de D.O.<sub>640 nm</sub> de aproximadamente 0,4. Em seguida, as células foram recolhidas por centrifugação e procedeu-se à inoculação com  $4 \times 10^6$  células/ml ou  $4 \times 10^7$  células/ml de “mosto amuado simulado” contendo glucose ou frutose. As fermentações em “mosto amuado simulado” foram realizadas em tubos de vidro de 3 cm de diâmetro contendo 15 ml de meio, ou em balões Erlenmeyer de 250 ml contendo 150 ml de meio, tapados com rolhas de borracha, a 20 °C e 120 rpm. O “mosto amuado simulado”, com um pH ajustado para 3,7 apresenta a seguinte composição: glucose ou frutose (2,5%, p/v), extracto de levedura (1%, p/v), peptona (2%, p/v), etanol (12%, v/v) e ácido acético (0,06%, v/v).

### 2.2.4 Experiências de adaptação ao etanol

Nas experiências de adaptação ao etanol, a estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792 foi testada quanto ao consumo de frutose em diferentes condições de crescimento (fase estacionária e fase exponencial) e com diferentes condições de adaptações ao etanol. Para a obtenção de um pré-inóculo, as células foram cultivadas em 50 ml de meio YPD, a 26 °C e 140 rpm, até atingirem um valor de D.O.<sub>640 nm</sub> de aproximadamente 0,4 para a fase exponencial e de 4 para a fase estacionária. Em seguida, as células do pré-inóculo foram recolhidas por centrifugação e foram ressuspensas em igual volume de meio YPD, com ou sem glucose, e com diferentes concentrações de etanol (6, 10, 12 e 14%, v/v). Estas culturas foram incubadas a 26 °C e 140 rpm, durante o tempo pretendido (2, 6 e 24 horas) e seguidamente foram recolhidas e testadas em “mosto amuado simulado” a uma concentração de  $4 \times 10^6$  células/ml, em balões Erlenmeyer como descrito na secção anterior.

### 2.2.5 Transporte membranar de açúcares

Para avaliação do transporte transmembranar de glucose utilizaram-se células em fases de crescimento exponencial e estacionária, e em condições de adaptação ao etanol (células em fase exponencial, adaptadas durante duas horas em meio YPD com etanol 6%, v/v). Para obtenção de células em fase exponencial e estacionária, prepararam-se culturas em meio YPD, a 26 °C e 140 rpm, até atingirem um valor de D.O.<sub>640 nm</sub> de aproximadamente 0,4 para a fase exponencial e de 4 para a fase estacionária. Em seguida, as células foram recolhidas por centrifugação, lavadas duas vezes com água desionizada ultrapura a 4 °C, e ressuspendidas em água desionizada ultrapura de modo a padronizar as suspensões celulares para uma D.O. <sub>640 nm</sub> entre 50 e 60. No caso de células adaptadas ao etanol utilizou-se o procedimento descrito na secção 2.1.4.

Para a quantificação de biomassa seca, pipetaram-se 100 µl das suspensões celulares para uma caixa de papel de estanho, previamente pesada. Voltou-se a pesar a caixa depois de colocada numa estufa a 80 °C, durante 24 horas. A biomassa foi expressa em mg de peso seco por ml de suspensão celular.

## 2.3 Doseamento de açúcares por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

A quantificação de açúcares dos ensaios descritos nos pontos 2.2.1 e 2.2.3 foi feita por HPLC. Foram retiradas amostras ao longo do tempo, centrifugadas à velocidade 16000 g durante 5 minutos, congelando-se em seguida o sobrenadante a -20 °C para análise posterior. Para a quantificação de glucose foi utilizado como padrão interno a L-arabinose e para quantificação de frutose a D-glucose. A concentração dos padrões internos foi definida em função das concentrações esperadas das amostras a determinar. Utilizou-se um cromatógrafo Gilson, com um detector 132-RI e uma coluna de hidratos de carbono H<sup>+</sup> (Hypersil-SS-100, H<sup>+</sup>), mantida a 30 °C. Como fase móvel foi utilizada uma solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,0025 M, a um fluxo de 0,5 ml min<sup>-1</sup>.

## 2.4 Doseamento de açúcares pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS)

O doseamento de açúcares do ensaio descrito no ponto 2.2.4 foi realizado pelo método do DNS. Este método foi descrito por Sumner (1944) e baseia-se na formação de um complexo de cor castanho-alaranjado, por redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicílico pelos açúcares redutores. A concentração desse complexo corado é proporcional à concentração de açúcares redutores na amostra.

As amostras foram retiradas ao longo do tempo, centrifugadas à velocidade de 16000 g durante 5 minutos, congelando-se em seguida o sobrenadante a -20 °C para análise posterior. O doseamento foi realizado em tubos de ensaio, por adição de 0,25 ml de solução a analisar (amostra ou padrão contendo frutose entre 0,2 e 1 g/L) a 0,25 ml de solução de DNS. Incubou-se seguidamente num banho de água a ferver durante 5 minutos e arrefeceu-se em água corrente. Após a adição de 2,5 ml de água desionizada fria e agitação no vórtex, leu-se a absorvância a 540 nm, num espectrofotómetro, contra um branco preparado em condições idênticas às das amostras mas utilizando 0,25 ml de água desionizada em substituição da amostra. Através da curva de calibração traçada obteve-se a concentração de frutose das amostras.

## 2.5 Isolamento de colónias *petits* e de mutantes respiratórios rho<sup>0</sup>

Para o isolamento e identificação de mutantes respiratórios repicaram-se colónias *petits* das estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5792 e PYCC 5793, provenientes de espalhamentos em placas YPDA contendo etanol (14%, v/v) e ácido acético (0,6%, v/v), para meio sólido YPD e YPGlicerol [extracto de levedura (0,5%, p/v), peptona (1,0%, p/v), glicerol (2,0%, p/v) e agar (2,0%, p/v)].

Para a identificação de mutantes respiratórios rho<sup>0</sup> procedeu-se à marcação por DAPI das colónias que exibiram crescimento em meio sólido YPD mas não em meio YPGlicerol. As células foram fixadas em 1 ml de formaldeído durante 30 minutos, recolhidas por centrifugação, lavadas uma vez com PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anidro 0,12%, p/v, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anidro 0,02%, p/v, NaCl 0,2%, p/v e KCl 0,02%, p/v) e ressuspensas em 0,5 ml do mesmo

tampão. Foram em seguida incubadas com 1 µg/ml de DAPI (4,6-diamido-2-fenil-indole), durante 20 minutos à temperatura ambiente. Por observação num microscópio de epifluorescência (Leitz Labor-luxS) seleccionaram-se as colónias que não apresentavam marcação de DNA mitocondrial.

## 2.6 Transporte de glucose

Para a medição das velocidades iniciais de entrada de glucose em células de levedura, colocaram-se num tubo de 10 ml de fundo cónico, 30 µl de uma solução  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 M (pH 5,0) e 10 µl de suspensão celular preparada como descrito na secção 2.1.5. Esta mistura foi incubada durante 1 minuto, num banho termoeletrizado a 26° C. Para a medição das velocidades iniciais de entrada de glucose, na presença de etanol, substituiu-se o tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 M (pH 5,0) pelo mesmo tampão contendo 12% (v/v) de etanol e o tempo de incubação foi de 5 minutos. Após o tempo de incubação respectivo, a reacção foi iniciada pela adição de 10 µl de solução aquosa de  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$  glucose, com concentração desejada. A reacção foi interrompida após 5 segundos, pela adição de 5 ml de água desionizada a 4 °C. Em seguida, a mistura foi rapidamente filtrada num sistema de vácuo, através de uma membrana (Whatman GF/C) e lavada com 10 ml de água desionizada a 4 °C. A membrana foi em seguida introduzida em frascos contendo 5 ml de líquido de cintilação (Optiphase HiSafe II, Wallac) e procedeu-se à leitura de radioactividade incorporada pelas células, num contador de cintilações Packard Tri-Carb 2200 CA (Packard Instrument Co., Inc.), equipado com correcção de “quenching”.

Para analisar a contribuição da adsorção inespecífica do substrato às células ou ao filtro foram feitos controlos, que consistiram em ensaios em que se seguiu o protocolo acima descrito, invertendo no entanto os passos de adição de composto radioactivo e água.

A gama de concentrações de glucose utilizadas variou entre 0,25 mM e 61,08 mM. Estas soluções foram preparadas por diluições consecutivas, com água desionizada, de uma solução mãe. A solução mãe foi preparada por mistura, nas proporções adequadas, de uma solução radioactiva com uma actividade específica de 317 mCi/mmol, fornecida pela Amersham International, com uma solução de glucose não radioactiva.

---

*Capítulo 3*

**Caracterização de estirpes comerciais vínicas de  
*Saccharomyces cerevisiae* e de estirpes não-  
*Saccharomyces* em função da fonte de azoto e da  
presença de etanol e/ou ácido acético no meio de  
cultura**

---

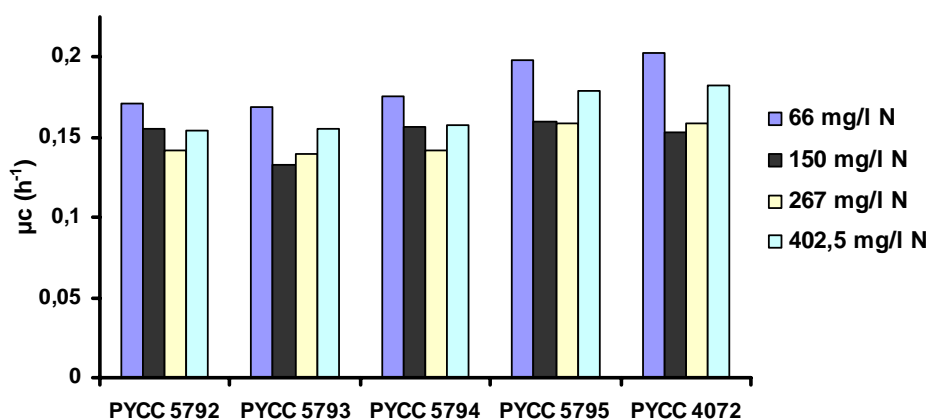


### 3.1 Avaliação do crescimento e da capacidade fermentativa em função da concentração de azoto assimilável no meio de cultura

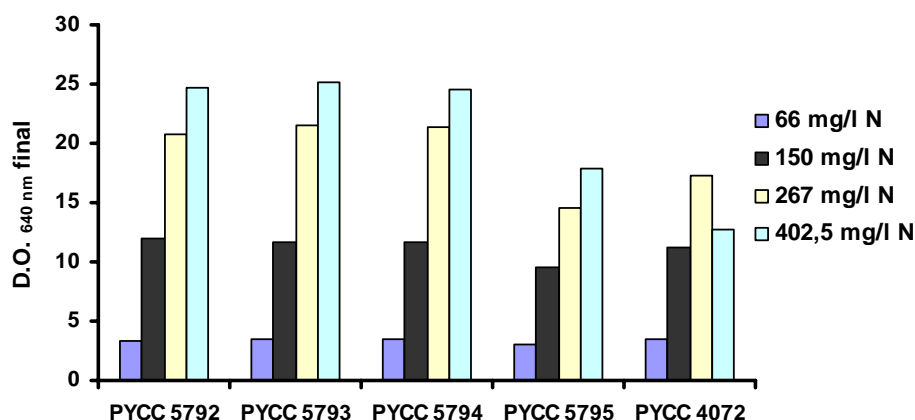
A falta de azoto assimilável dos mostos é frequentemente apontada como causa de paragem de fermentação como referido na introdução. Deste modo, pretendeu-se comparar as diferentes estirpes vínicas no que respeita à sua dependência da concentração da fonte de azoto no meio de cultura. Com este objectivo, procedeu-se à determinação das taxas específicas de crescimento, da biomassa final (expressa por  $D.O_{final}$ ), e da velocidade fermentativa (avaliada pela perda de peso associada ao consumo de glucose e consequente libertação de  $CO_2$  do meio de cultura) das leveduras em estudo (*S. cerevisiae* PYCC 5792, *S. cerevisiae* PYCC 5793, *S. cerevisiae* PYCC 5794 e *S. cerevisiae* PYCC 5795) na presença de diferentes concentrações de azoto no meio de cultura. Utilizou-se sulfato de amónio como fonte de azoto em concentrações que variaram entre 66 mg/L e 402,5 mg/L de azoto assimilável e as fermentações foram conduzidas a 20 °C. Para efeitos de comparação, foi também ensaiada a estirpe laboratorial *S. cerevisiae* PYCC 4072.

De acordo com os resultados obtidos, no que respeita às taxas específicas de crescimento (Figura 3.1) não se observaram diferenças significativas no comportamento das diferentes estirpes, independentemente da concentração inicial de azoto. Quanto ao parâmetro “biomassa final” (Figura 3.2) embora as diferenças entre as estirpes não sejam acentuadas, é de registar que para todas foi verificado um incremento no rendimento em biomassa com as crescentes concentrações de azoto como esperado. Para as concentrações de 66 e 150 mg/L de azoto, o rendimento em biomassa foi praticamente igual para todas as estirpes. Em contrapartida, para as concentrações de 267 e 402,5 mg/L de azoto as estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5792, *S. cerevisiae* PYCC 5793 e *S. cerevisiae* PYCC 5794, comparativamente com as restantes, evidenciaram maior produção de biomassa final. Estes resultados comprovam que baixos níveis iniciais de azoto limitam a formação de biomassa (Mendes-Ferreira *et al*, 2004).





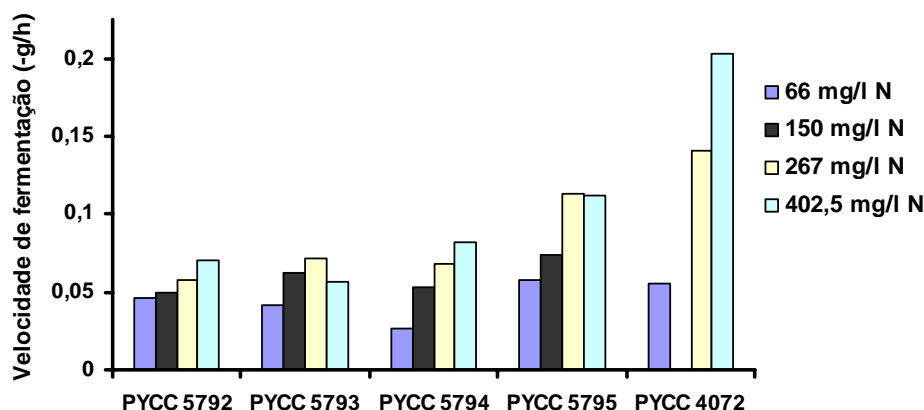
**Figura 3.1** – Variação da taxa específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ ) das diferentes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* com concentrações crescentes de azoto no meio. Os ensaios foram conduzidos a 20 °C e a 120 rpm, em balões de 500 ml contendo 300 ml de meio de cultura e um inóculo de  $4,0 \times 10^6$  cel/ml.



**Figura 3.2** – Variação da “biomassa final” das diferentes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, expressa em valores de D.O. a 640 nm, com concentrações crescentes de azoto no meio. Os ensaios foram conduzidos a 20°C e a 120 rpm, em balões de 500 ml contendo 300 ml de meio de cultura e um inóculo de  $4,0 \times 10^6$  cel/ml.

Analisando a capacidade fermentativa das estirpes (Figura 3.3), verifica-se que tal como nas taxas específicas de crescimento, as estirpes não diferem significativamente na sua velocidade fermentativa da glucose e esta, por sua vez, variou ligeiramente com o aumento da concentração de azoto. Apenas as estirpes *S. cerevisiae* PYCC 4072 e PYCC 5795

parecem demonstrar um aumento da velocidade de fermentação para concentrações de azoto mais elevada. Estas estirpes foram também as que apresentaram uma menor produção de biomassa para as concentrações de azoto mais elevadas.



**Figura 3.3** – Variação da velocidade de fermentação, expressa em perda de peso da cultura por unidade de tempo (g/h), das diferentes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* com concentrações crescentes de azoto no meio. Os ensaios foram conduzidos a 20 °C e a 120 rpm, em balões de 250 ml contendo 150 ml de meio de cultura e um inóculo de  $4,0 \times 10^6$  cel/ml.

Procedeu-se ainda à determinação do tempo necessário ao esgotamento do açúcar no meio de cultura (concentração inicial de açúcar 200 g/L), para cada uma das estirpes em estudo e nas diferentes concentrações de azoto assimilável. Analisando os resultados sumariados nas tabelas que se seguem (Tabelas – 3.1 a 3.4), verifica-se que, também neste parâmetro, não há diferenças significativas na resposta das diferentes estirpes. Em todas as estirpes, observa-se que o consumo de açúcar foi total para as concentrações de azoto acima de 150 mg/l, tendo o tempo de consumo diminuído com o aumento da concentração do azoto de acordo com o aumento das taxas de fermentação observado. Apenas a estirpe *S. cerevisiae* PYCC 4072, para a concentração de 402,5 mg/L, não completou o consumo de glucose, devendo-se possivelmente a erro de amostragem.

**Tabela 3.1** – Concentração residual de glucose, após 222 horas da fermentação, em meio de cultura contendo 66 mg/L N, para as diferentes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Estirpe	[glucose] g/L
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5792	130,6
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5793	189,3
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5794	148,0
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5795	135,1
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 4072	104,1

**Tabela 3.2** Concentração de glucose para diferentes tempos de fermentação em meio de cultura contendo 150 mg/L N, para as diferentes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Estirpe	[glucose] g/L	[glucose] g/L	[glucose] g/L
	217,16 horas	239,16 horas	335,16 horas
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5792	34,0	20,0	-
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5793	29,9	12,3	0,249
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5794	20,9	9,04	-
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5795	41,1	26,7	-
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 4072	28,8	23,9	19,0

**Tabela 3.3** Concentração de glucose para diferentes tempos de fermentação em meio contendo 267 mg/L N, para as diferentes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Estirpe	[glucose] g/L	[glucose] g/L
	78 horas	196 horas
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5792	83,4	0,0050
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5793	77,9	0,0026
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5794	66,3	0,0019
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5795	70,5	0,0012
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 4072	14,4	0,0012

**Tabela 3.4** Concentração de glucose para diferentes tempos de fermentação em meio contendo 402,5 mg/L N, para as diferentes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Estirpe	[glucose] g/L	[glucose] g/L
	78,5 horas	141,5 horas
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5792	0,864	0,0025
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5793	0,348	0,0011
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5794	0,0258	0,0020
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5795	15,50	0,0058
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 4072	65,00	58,90

### 3.2 Avaliação da resistência das estirpes ao etanol e/ou ácido acético, expressa em termos de perda de viabilidade celular

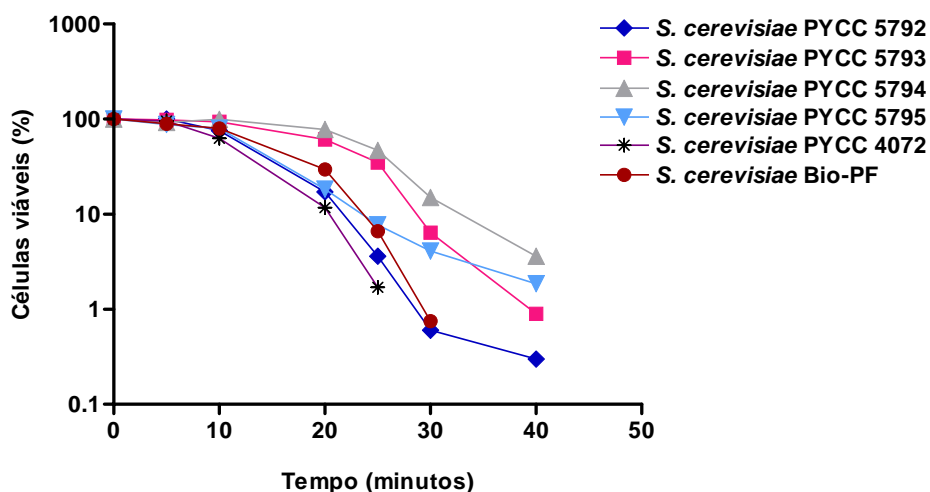
Elevadas concentrações de etanol são apresentadas como uma das principais causas de amuos de fermentação. Adicionalmente outros sub-produtos da fermentação como ácido acético podem potenciar os efeitos tóxicos do etanol.

Neste estudo foram caracterizadas estirpes de levedura no que respeita ao seu perfil de resposta à presença de etanol e ácido acético. Deste modo, analisou-se a capacidade de sobrevivência celular, avaliada por contagem de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) em meio de cultura apropriado, de leveduras quando submetidas à presença de diferentes concentrações de etanol e/ou ácido acético.

Foram analisadas as seguintes estirpes: *S. cerevisiae* PYCC 5792, *S. cerevisiae* PYCC 5793, *S. cerevisiae* PYCC 5794, *S. cerevisiae* PYCC 5795, *S. cerevisiae* PYCC 4072, *S. cerevisiae* PYCC 5792 rho<sup>0</sup>, *S. cerevisiae* PYCC 5793 rho<sup>0</sup>, *S. cerevisiae* Bio PF, *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307, *Torulaspora delbrueckii* PYCC 5321 e *Torulaspora delbrueckii* PYCC 5323.

### 3.2.1 Efeito do ácido acético (2%, v/v) na viabilidade celular a 20 °C e a 26 °C

A incubação das leveduras em meio de cultura contendo 2% (v/v) de ácido acético durante 40 minutos, a 26 °C levou a uma elevada perda da viabilidade celular. A estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5794 revelou-se como sendo a mais resistente à presença deste ácido no meio de cultura, seguindo-se as estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5793 e PYCC 5795 (Figura 3.4). As estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5792 e PYCC 4072 demonstraram ser mais sensíveis, apresentando valores da taxa específica de morte celular ( $k_d$ ) mais elevados ( $0,476 \text{ min}^{-1}$  e  $0,336 \text{ min}^{-1}$ , respectivamente) (Tabela 3.5).

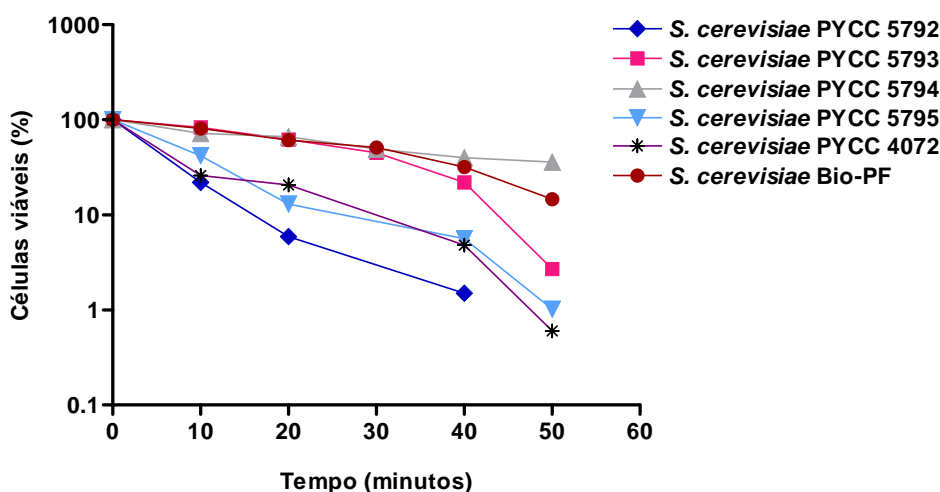


**Figura 3.4** - Percentagem de células viáveis (contagem de UFC) em função do tempo, das estirpes analisadas, em meio YPD contendo ácido acético (2%, v/v), a 26 °C.

Quando as experiências decorreram a 20 °C, as estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5794 e *S. cerevisiae* Bio-PF mostraram ser as mais resistentes, apresentando valores de  $k_d$  mais baixos, em comparação com os valores de  $k_d$  apresentados pelas estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5793, 5795 e 4072. Os resultados são apresentados na tabela 3.5 e na figura 3.5. *S. cerevisiae* PYCC 5792 revelou-se como a estirpe mais sensível com um valor de  $k_d$  de  $0,103 \text{ min}^{-1}$ .

**Tabela 3.5** – Taxas específicas de morte para as diferentes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, a 20 e 26 °C, em meio YPD contendo 2% (v/v) de ácido acético.

Estirpes	$k_d$ ( $\text{min}^{-1}$ ) 26 °C	$k_d$ ( $\text{min}^{-1}$ ) 20 °C
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5792	0,336	0,103
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5793	0,211	0,064
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5794	0,167	0,021
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 5795	0,150	0,084
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 4072	0,476	0,091
<i>S. cerevisiae</i> PYCC BioPF	0,368	0,036



**Figura 3.5** - Percentagem de células viáveis (contagem de UFC) em função do tempo, das estirpes analisadas, em meio YPD contendo ácido acético (2%, v/v), a 20 °C.

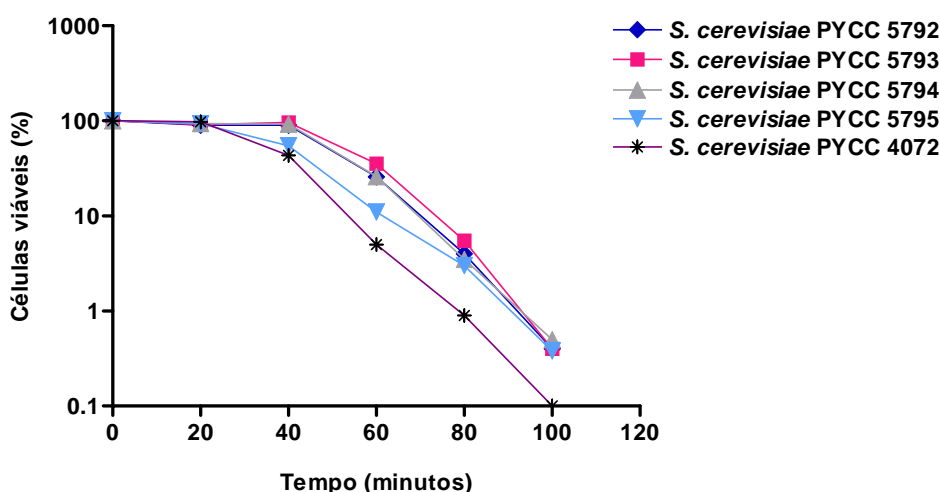
Com a diminuição da temperatura, e para todas as estirpes analisadas, a resistência a 2% (v/v) de ácido acético aumentou, verificando-se uma diminuição acentuada dos valores das respectivas constantes de morte (Tabela 3.5). Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores em que se verificou que em *S. cerevisiae*, a diminuição da temperatura de 28 °C para 25 °C levava a um decréscimo dos valores de  $k_d$ , tendo sido obtidos

resultados idênticos na presença de outros ácidos orgânicos, como o propiônico, butírico e pentanóico (Cardoso e Leão, 1992).

No que se refere à resistência relativa das estirpes, esta manteve-se de um modo geral para as duas temperaturas testadas (20 e 26 °C) salientando-se a estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5794 como a mais resistente para ambas as temperaturas testadas, e as estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5792 e 4072 como as mais sensíveis.

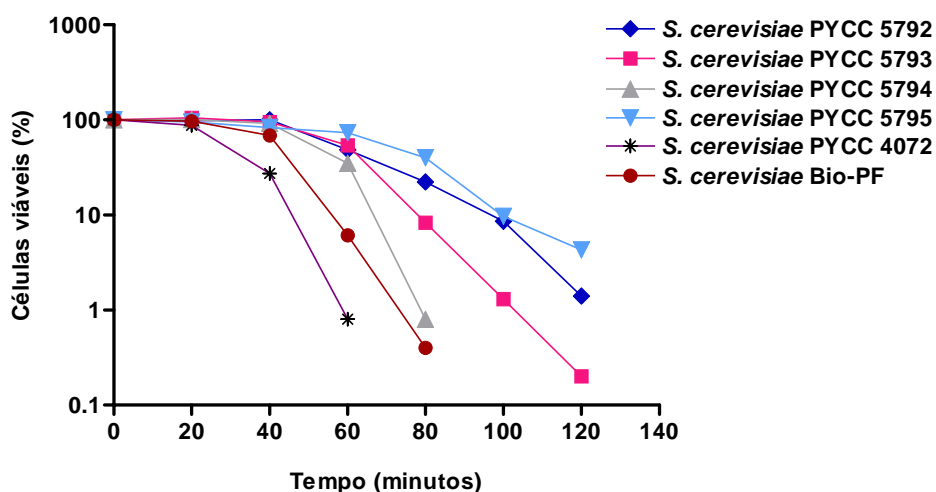
### 3.2.2 Efeito conjugado de ácido acético e etanol na viabilidade celular à temperatura de 20 °C e 26 °C

A exposição das diferentes estirpes num meio de cultura contendo 0,6% (v/v) de ácido acético e 10% (v/v) de etanol e à temperatura de 26 °C, não revelou diferenças significativas no comportamento das estirpes (Figura 3.6). Tal como se verificou em presença de 2% (v/v) de ácido acético, a estirpe *S. cerevisiae* PYCC 4072 continua a demonstrar comportamento mais sensível comparativamente com as restantes leveduras.



**Figura 3.6** - Percentagem de células viáveis (contagem de UFC) em função do tempo, das estirpes analisadas, em meio YPD contendo ácido acético (0,6%, v/v) e etanol (10%, v/v) a 26 °C.

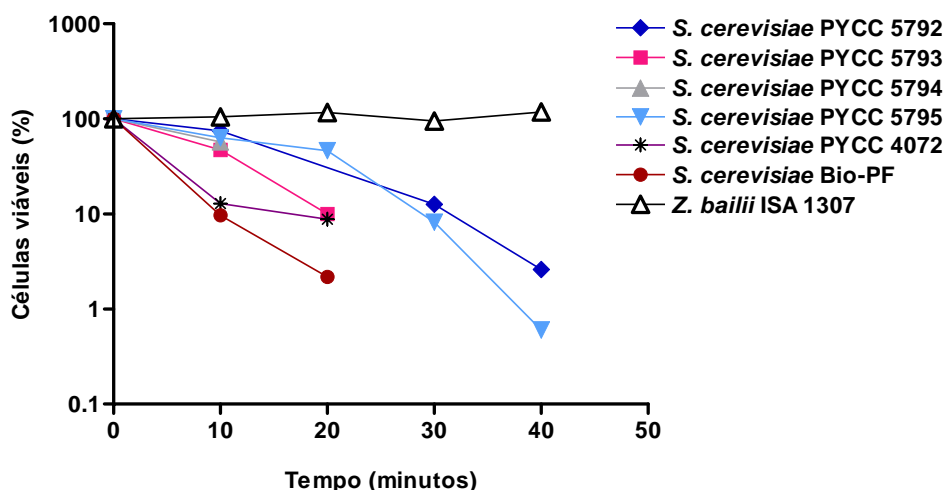
Por análise da figura 3.7, verifica-se que à temperatura de 20 °C e em meio contendo 0,6% (v/v) de ácido acético e 14% (v/v) de etanol, as leveduras *S. cerevisiae* PYCC 4072 ( $k_d = 0,117 \text{ min}^{-1}$ ) e *S. cerevisiae* Bio-PF ( $k_d = 0,128 \text{ min}^{-1}$ ) demonstraram ser as mais sensíveis seguidas da estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5794 ( $k_d = 0,118 \text{ min}^{-1}$ ). A estirpe mais resistente foi *S. cerevisiae* PYCC 5795 ( $k_d = 0,048 \text{ min}^{-1}$ ) seguida pelas estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5792 ( $k_d = 0,060 \text{ min}^{-1}$ ) e PYCC 5793 ( $k_d = 0,093 \text{ min}^{-1}$ ).



**Figura 3.7** - Percentagem de células viáveis (contagem de UFC) em função do tempo, das estirpes analisadas, em meio YPD contendo ácido acético (0,6%, v/v) e etanol (14%, v/v) a 20 °C.

Quando se aumentou a concentração de etanol do meio (18%, v/v), mantendo as restantes condições do ensaio, a perda de viabilidade foi muito acentuada para todas as estirpes de *S. cerevisiae* testadas, como se pode observar na figura 3.8.





**Figura 3.8** - Percentagem de células viáveis (contagem de UFC) em função do tempo, das estirpes analisadas, em meio YPD contendo ácido acético (0,6%, v/v) e etanol (18%, v/v), a 20 °C.

De acordo com os dados da literatura, a estirpe *Z. bailii* ISA 1307 apresenta maior resistência quando comparada com a levedura *S. cerevisiae* PYCC 4072 em estudos de viabilidade celular, onde foram testados os efeitos do ácido acético e etanol (Fernandes *et al.*, 1999). Por este motivo introduzimos esta estirpe nos nossos ensaios para comparar o seu comportamento relativamente às estirpes comerciais de *S. cerevisiae* em estudo. Nas experiências realizadas nas nossas condições (temperatura 20 °C e meio contendo 0,6% (v/v) de ácido acético e 18% (v/v) de etanol) não se verificou qualquer perda de viabilidade celular para esta levedura, sendo portanto a estirpe mais resistente do ensaio.

Das estirpes *S. cerevisiae* testadas destacam-se as leveduras PYCC 5792 e PYCC 5795 como sendo as mais resistentes, e a levedura PYCC 4072 pela menor resistência (Figura 3.8).

Como seria de esperar, à medida que se aumentou a concentração de etanol no meio de cultura, as estirpes foram perdendo resistência, traduzida numa perda da viabilidade celular mais acentuada. Em *S. cerevisiae*, a uma temperatura constante, as taxas específicas de morte celular estão relacionadas, por uma função exponencial, com a concentração de

etanol (Leão e van Uden, 1982). Uma vez que a concentração de ácido acético foi mantida constante, o aumento da perda de viabilidade celular estará provavelmente associado às concentrações crescentes de etanol presentes nos ensaios. Por outro lado, o aumento da concentração de etanol, aumenta a difusão passiva do ácido acético, em células cultivadas na presença de glucose, com as constantes de difusão a aumentarem de forma exponencial com a concentração de etanol (Casal *et al.*, 1998). Assim o efeito tóxico do ácido acético poderá também aumentar com o aumento da concentração de etanol no meio.

Verificou-se ainda que a estirpe *Z. bailii* que apresenta uma elevada resistência ao ácido acético (Sousa *et al.*, 1996) é também bastante tolerante a concentrações elevadas de etanol. Esta resistência ao etanol poderá estar relacionada com propriedades da membrana plasmática, um dos alvos preferenciais do etanol em leveduras. Em estudos efectuados, quando sujeita a concentrações até 20% (v/v) de etanol, *Z. bailii* não demonstrou qualquer aumento no influxo de protões por difusão passiva, comprovando que a permeabilidade da membrana não foi significativamente afectada pela presença de etanol (Quintas *et al.*, 2000).

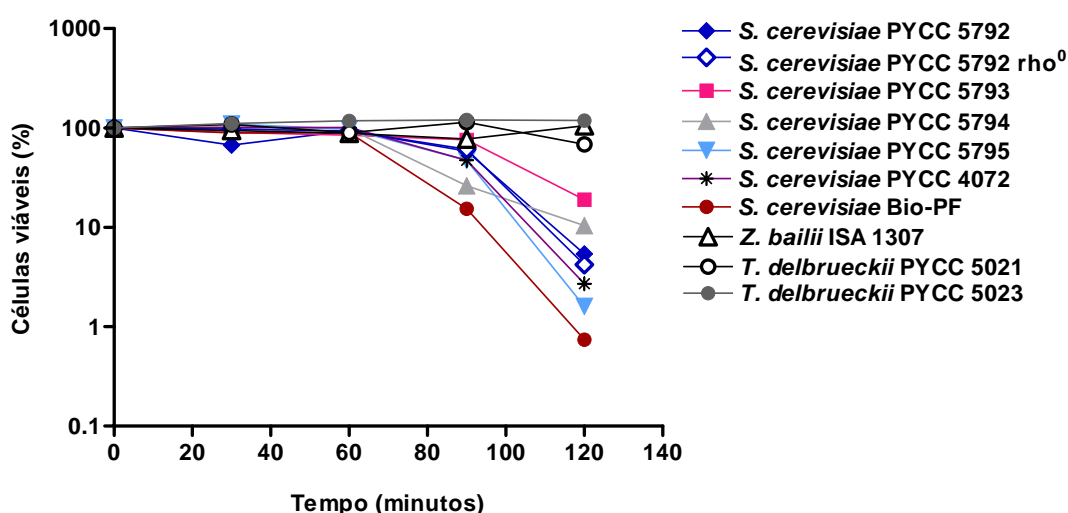
Apesar de não ser a mais resistente em todas as condições testadas, a estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792 apresentou, no conjunto, os melhores resultados. Por outro lado, a estirpe *S. cerevisiae* PYCC 4072 demonstrou ser a mais sensível para todas as condições testadas.

Sendo um dos objectivos deste trabalho a selecção das estirpes com melhor desempenho na fase final da fermentação, foi analisada a capacidade de sobrevivência celular, avaliada por contagem de Unidades Formadoras de Colónias (CFU), numa gama mais alargada de estirpes de leveduras e num meio de cultura em que se manteve a concentração de etanol (18%, v/v), e se baixou a concentração de ácido acético para um valor mais próximo dos encontrados frequentemente em mostos amuados (0,06% v/v). As estirpes testadas foram as indicadas na secção dos materiais e métodos.

Das leveduras testadas, as que se revelaram mais resistentes em meio com ácido acético 0,06% (v/v) e etanol 18% (v/v), a 20 °C, foram as estirpes *T. delbrueckii* PYCC 5323 e PYCC 5321, e *Z. bailii* ISA 1307, seguidas das estirpes de *S. cerevisiae* PYCC 5792 rho<sup>0</sup>, PYCC 5793 e PYCC 5792 (Figura 3.9). Tanto as estirpes de *T. delbrueckii* como a estirpe *Z. bailii* ISA 1307 demonstraram uma elevada tolerância a 18% (v/v) de

etanol e 0,06% (v/v) de ácido acético, apresentando uma taxa de sobrevivência de 100% durante os 120 minutos de exposição.

Quando comparados estes resultados com os obtidos para os ensaios efectuados a 20 °C em meio contendo 0,6% (v/v) de ácido acético e 18% (v/v) de etanol, observa-se que para as estirpes de *S. cerevisiae* houve um considerável aumento na viabilidade celular quando se diminuiu a concentração de ácido acético de 0,6 para 0,06% (v/v), na presença de 18% (v/v) de etanol. Estes resultados confirmam que no meio com 0,6% (v/v) de ácido acético e 18% (v/v) de etanol, uma parte considerável dos efeitos tóxicos observados poderá ser atribuído ao ácido acético.



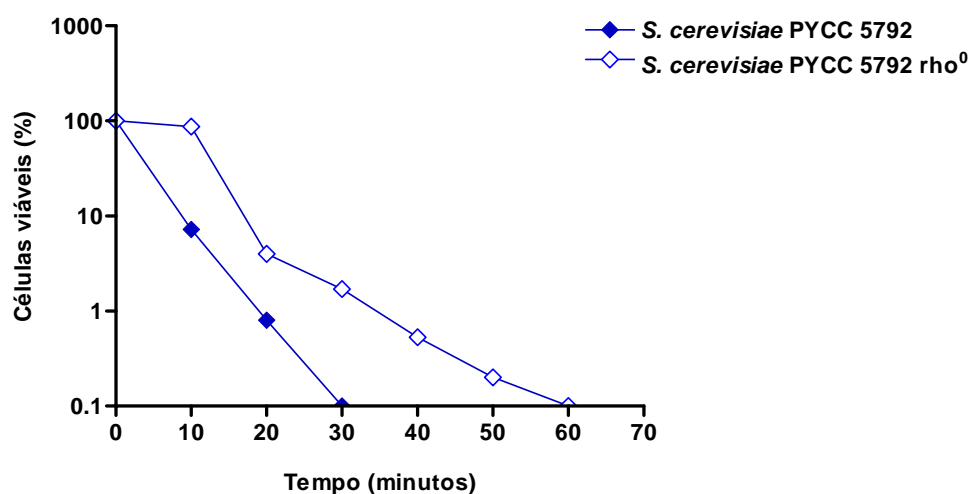
**Figura 3.9** - Percentagem de células viáveis (contagem de UFC) em função do tempo, das estirpes analisadas, em meio YPD contendo ácido acético (0,06%, v/v) e etanol (18%, v/v) a 20 °C.

Em contrapartida, *Z. bailii* não parece ser afectada pelas duas concentrações de ácido acético testadas na presença de 18% (v/v) de etanol. O facto desta espécie apresentar transporte activo de ácido acético, na presença de glucose, e inibição do mesmo na presença de etanol, permite-lhe tolerar ambientes com ácido acético e etanol, nos quais *S. cerevisiae* não sobrevive (Sousa *et al.*, 1996).

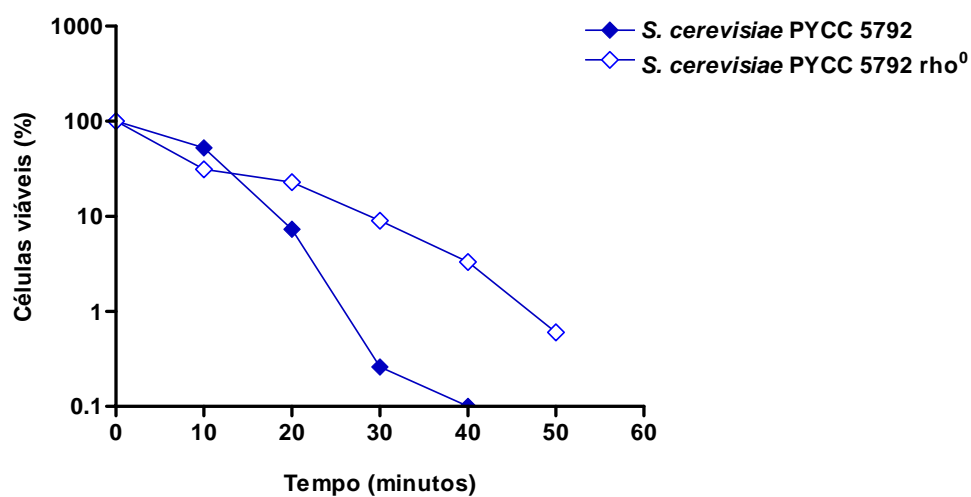
Em resultados obtidos anteriormente, *T. delbrueckii* demonstrou uma elevada sensibilidade a concentrações elevadas de etanol quando comparada com *S. cerevisiae*, em ensaios de viabilidade (Pina *et al.*, 2004a; 2004b). Contrariamente, no presente ensaio, foi observada uma elevada resistência ao etanol para as duas estirpes testadas. Estas discrepâncias poderão dever-se às diferenças das estirpes utilizadas nos referidos ensaios. As estirpes utilizadas no presente trabalho são leveduras de panificação caracterizadas pela sua elevada tolerância ao congelamento e stresse osmótico (Alves-Araújo *et al.*, 2004; Hernandez-Lopez *et al.*, 2003). Esta tolerância ao congelamento está relacionada com uma melhor capacidade em preservar a integridade da membrana do que *S. cerevisiae*, devido à maior resistência apresentada por *T. delbrueckii* aos danos provenientes da oxidação lipídica (Alves-Araújo *et al.*, 2004). Esta maior resistência à oxidação lipídica, poderá também estar na base da significativa tolerância observada para elevadas concentrações de etanol.

### **3.2.3 Efeito do ácido acético (2%, v/v) e o efeito combinado de ácido acético (0,6%, v/v) e etanol (18% v/v) na viabilidade celular de um mutante respiratório da estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792**

A estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792  $\rho^0$  é um mutante respiratório  $\rho^0$ , obtido a partir da estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792 quando esta foi sujeita a condições de tratamento com ácido acético e etanol. Em ambas as condições experimentais testadas, ácido acético e ácido acético mais etanol, a 20 °C, o mutante respiratório, apresentou resistência mais elevada comparativamente à estirpe parental *S. cerevisiae* PYCC 5792 (Figuras 3.10 e 3.11).



**Figura 3.10** – Percentagem de células viáveis (contagem de UFC) em função do tempo, das estirpes analisadas, em meio YPD contendo ácido acético (0,6% v/v) e etanol (18% v/v) a 20°C.



**Figura 3.11** – Percentagem de células viáveis (contagem de UFC) em função do tempo, das estirpes analisadas, em meio YPD contendo ácido acético (2% v/v) a 20°C.

A maior tolerância ao etanol e ácido acético, apresentada pelo mutante respiratório em relação à estirpe parental, está de acordo com resultados obtidos anteriormente. Nestes mutantes, a indução, por etanol, da produção de espécies reactivas de oxigénio, na mitocôndria, está comprometida devido à ausência de DNA mitocondrial, tornando-os assim mais resistentes à presença de etanol (Costa *et al.*, 1997).

Por outro lado o ácido acético induz em *S. cerevisiae* um processo de morte celular programada dependente da mitocôndria (Ludovico *et al.*, 2002; Wissing *et al.*, 2004) justificando a maior resistência do mutante rho<sup>0</sup>.

A avaliação da resistência das diferentes estirpes estudadas ao ácido acético e ácido acético mais etanol, permite verificar que as estirpes de *S. cerevisiae* com maior resistência a concentrações elevadas de ácido acético exibem resistências mais baixas na presença de elevadas concentrações de etanol conjugadas com baixas concentrações ácido acético, sugerindo que estes dois agentes de stresse poderão actuar sobre alvos diferentes na levedura.



---

*Capítulo 4*

**Seleccção de estirpes e de condições de adaptação  
mais adequadas ao re arranque de fermentações  
amuadas**

---





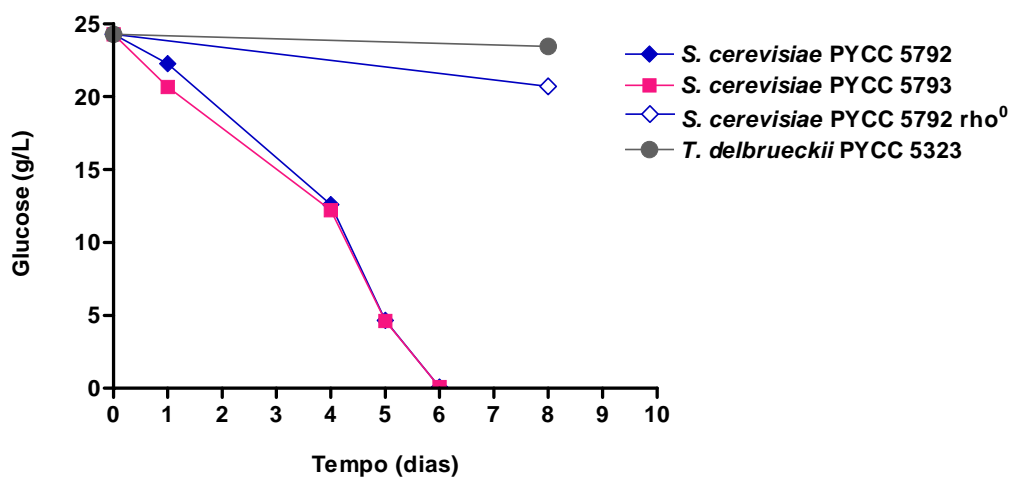
#### 4.1 Comportamento das estirpes de leveduras seleccionadas em ‘mosto amuado simulado’ com 12% v/v de etanol, à temperatura de 20 °C

Com o objectivo final de obter estirpes melhoradas para fermentar a frutose residual nos mostos para os quais se observa um abrandamento ou paragem da fermentação, e com base nos resultados obtidos anteriormente, foram seleccionadas as estirpes que se apresentaram mais resistentes à presença simultânea de etanol e ácido acético.

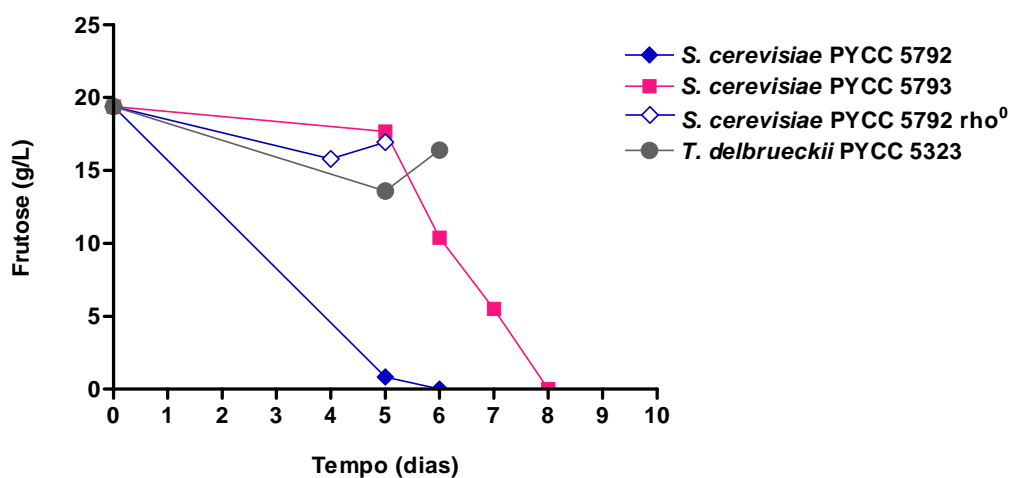
Deste modo as estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5792, *S. cerevisiae* PYCC 5793, *S. cerevisiae* PYCC 5792 rho<sup>0</sup>, *S. cerevisiae* Bio-PF, *Zygosaccharomyces bailii* ISA 1307 e *Torulaspora delbrueckii* PYCC 5323 foram utilizadas em ensaios de consumo de açúcar em meios que simulam “mosto amuado”, contendo glucose ou frutose (2,5%, p/v), extracto de levedura (1%, p/v), peptona (2%, p/v), etanol (12%, v/v) e ácido acético (0,06%, v/v), de modo a melhor reproduzir as condições de um mosto amuado.

De acordo com os resultados apresentados na figura 4.1, as estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5792 e *S. cerevisiae* PYCC 5793 foram muito mais rápidas no consumo total tanto de glucose como de frutose, quando comparadas com *S. cerevisiae* PYCC 5792 rho<sup>0</sup>, *S. cerevisiae* PYCC 5793 rho<sup>0</sup> e *T. delbrueckii* PYCC 5323, concluindo a fermentação em cerca de 6 dias. A estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792 mostrou o mesmo tempo de consumo tanto para glucose como para frutose distinguindo-se de *S. cerevisiae* PYCC 5793 que apresentou um maior tempo total de consumo em frutose do que em glucose. As estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5792 rho<sup>0</sup>, *S. cerevisiae* PYCC 5793 rho<sup>0</sup> e *T. delbrueckii* PYCC 5323 foram incapazes de consumir totalmente tanto glucose como frutose ao fim de 10 dias.

A)



B)



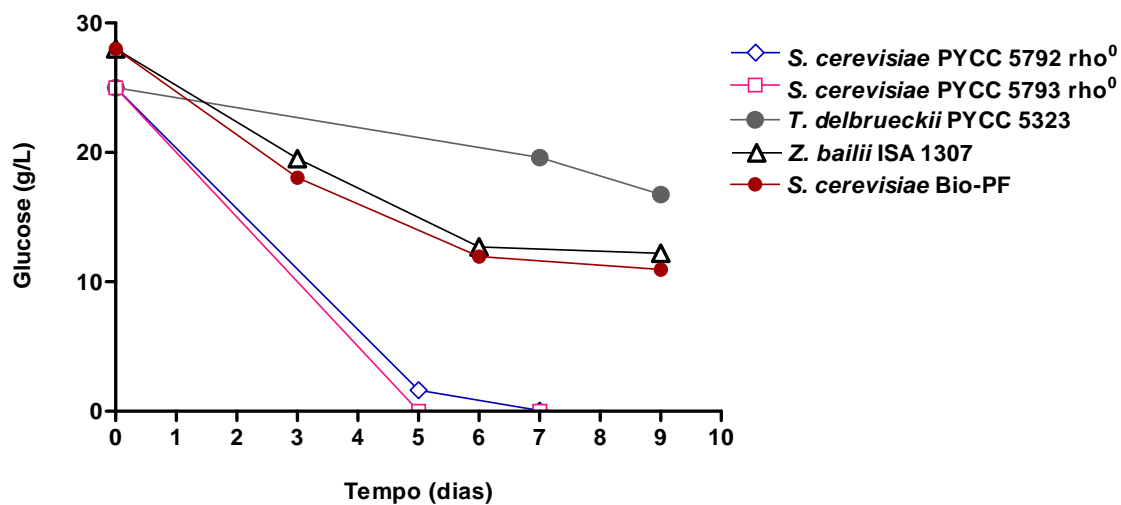
**Figura 4.1** – Consumo de glucose (A) e frutose (B) pelas estirpes seleccionadas em “mosto amuado simulado” contendo glucose ou frutose (2,5%, p/v), extracto de levedura (1%, p/v), peptona (2%, p/v), etanol (12%, v/v) e ácido acético (0,06%, v/v), a pH 3,7. Os ensaios foram conduzidos a 20 °C e 120 rpm, em balões de 250 ml contendo 150 ml de meio, com um inóculo de  $4,0 \times 10^6$  cel/ml.

Uma vez que para as estirpes *T. delbrueckii* PYCC 5323, *S. cerevisiae* PYCC 5792  $\rho^0$  e *S. cerevisiae* PYCC 5793  $\rho^0$  não se obteve um consumo total de açúcares, aumentou-se a densidade populacional do inóculo. Nestes ensaios foi também alargada a gama de estirpes testadas. Os ensaios foram realizadas em tubos de vidro com 15 ml de “mosto amuado simulado”, contendo glucose ou frutose e um inóculo de  $4 \times 10^7$  células/ml.

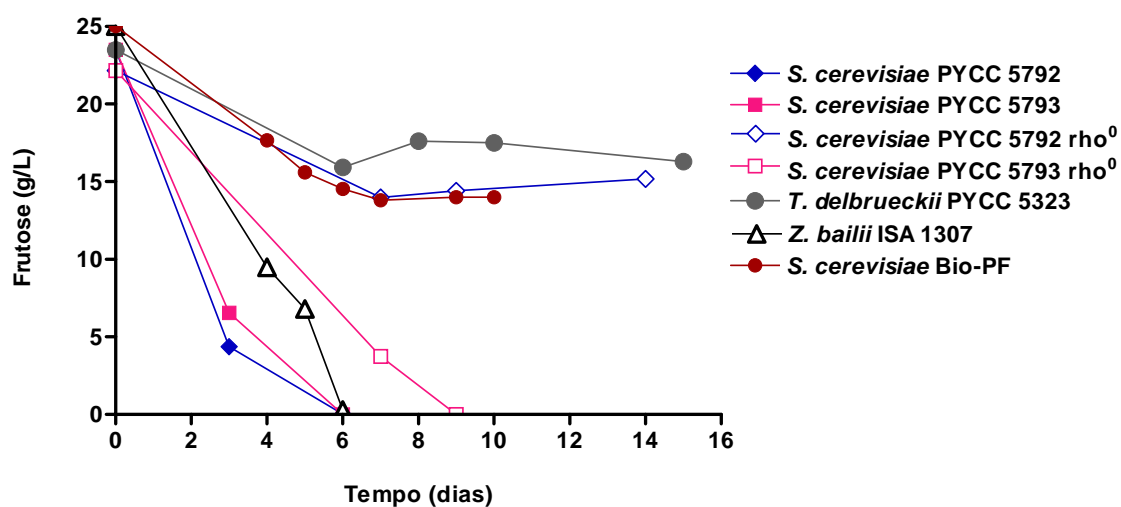
De acordo com os resultados apresentados na figura 4.2, para a estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792 verifica-se que o tempo necessário para o consumo total de açúcares foi de 6 dias. Para a *S. cerevisiae* PYCC 5793, o aumento da densidade do inóculo reduziu o tempo necessário ao consumo total para 6 dias. A estirpe *T. delbrueckii* PYCC 5323 não mostrou qualquer melhoria no consumo mediante o aumento do inóculo, não sendo capaz de terminar as fermentações. O mutante *S. cerevisiae* PYCC 5793  $\rho^0$  terminou ambas as fermentações ao contrário do mutante *S. cerevisiae* PYCC 5792  $\rho^0$  que apenas concluiu a fermentação em meio com glucose. Ambos os mutantes exibiram desempenhos de consumo inferiores às das respectivas estirpes selvagens. *Z. bailii* ISA 1307, uma levedura frutofílica (Sousa-Dias *et al.*, 1996), terminou em 6 dias a fermentação em meio com frutose, não sendo contudo capaz de concluir a fermentação em meio com glucose. *S. cerevisiae* Bio-PF mostrou-se incapaz de terminar ambas as fermentações.

Dados da literatura indicam que a estirpe *Z. bailii* ISA 1307, em meio YPD e condições anaeróbias, apresenta uma vigorosa capacidade fermentativa (Rodrigues *et al.*, 2001). Contudo, à temperatura de 20 °C e na presença de 12% (v/v) de etanol a capacidade fermentativa desta levedura não foi superior às observadas para estirpes de *S. cerevisiae*. Por outro lado, na presença de frutose esta estirpe demonstrou um rápido consumo, equiparando-se às estirpes de *S. cerevisiae* testadas. O facto da estirpe de *Z. bailii* em estudo apresentar um sistema de transporte específico para frutose de alta capacidade, com uma velocidade máxima ( $V_{\max}$ ) de  $6.7 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  em células cultivadas em frutose, em comparação com o sistema de transporte de glucose com menor capacidade ( $V_{\max}$  de  $1.7 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) em células cultivadas em glucose (Sousa-Dias *et al.*, 1996), poderá explicar esta discrepância entre consumo de glucose e frutose na presença de 12% (v/v) de etanol.

A)



B)



**Figura 4.2** – Consumo de glucose (A) e frutose (B) pelas estirpes seleccionadas em “mosto amuado simulado” contendo glucose ou frutose (2,5%, p/v), extracto de levedura (1%, p/v), peptona (2%, p/v), etanol (12%, v/v) e ácido acético (0,06%, v/v), a pH 3,7. Os ensaios foram conduzidos a 20 °C e 120 rpm, em tubos de vidro contendo 15 ml de meio, com um inóculo de  $4,0 \times 10^7$  cel/ml

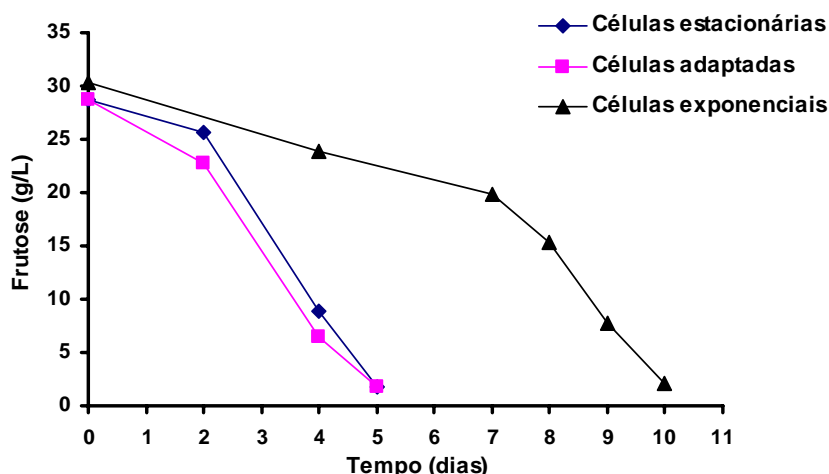
A incapacidade em completar ambas as fermentações demonstrada por *T. delbrueckii* poderá estar relacionada com as necessidades de oxigénio desta espécie. Em estudos efectuados verificou-se que esta levedura, em condições de anaerobiose, apresenta fraca capacidade fermentativa e baixo crescimento quando comparada com *S. cerevisiae* (Hansen *et al.*, 2001; Hanl *et al.*, 2005). Ao contrário do verificado para *S. cerevisiae*, a adição de ergosterol e ácido oleico, não compensou os efeitos inibitórios da anaerobiose no crescimento e actividade fermentativa de *T. delbrueckii*. Apenas o arejamento de fermentações conduzidas em anaerobiose, foi capaz de recuperar o crescimento e actividade fermentativa de *T. delbrueckii*, concluindo-se esta espécie exibe necessidades em oxigénio, para o crescimento, ainda desconhecidos (Maurício *et al.*, 1998).

Estes resultados, quando comparados com os obtidos nas experiências de avaliação de resistência das estirpes, permitem-nos concluir que não existe uma relação directa entre maior resistência às condições de stresse utilizadas e consumo de açúcar em presença dos mesmos agentes de stresse.

## **4.2 Comportamento em ‘mosto amuado simulado’ com 12% v/v de etanol, à temperatura de 20 °C: experiências de adaptação ao etanol**

Com o objectivo de seleccionar as condições de adaptação mais adequadas ao rearranque de paragens de fermentação, as estirpes seleccionadas foram ainda testadas em diferentes fases de crescimento e depois de diferentes processos de adaptação ao etanol.

Numa primeira fase, células da estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792 foram testadas quanto ao consumo de frutose em meio que simula “mosto amuado” em diferentes condições de crescimento (fase exponencial e fase estacionária) e adaptadas (em fase exponencial de crescimento) durante duas horas, em meio YPD, contendo etanol 6% (v/v). As células em fase estacionária e em fase exponencial previamente adaptadas apresentaram o consumo mais rápido de frutose do meio, tendo as células em fase exponencial de crescimento requerido o dobro do tempo para completarem este consumo (Figura 4.3).



**Figura 4.3** – Consumo de frutose pela estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792 em diferentes fases de crescimento e adaptadas (em fase exponencial de crescimento) durante duas horas em meio YPD contendo etanol 6% (v/v). No ensaio foi utilizado “mosto amuado simulado” contendo frutose (2,5%, p/v), extracto de levedura (1%, p/v), peptona (2%, p/v), etanol (12%, v/v) e ácido acético (0,06%, v/v), a pH 3,7. Os ensaios foram conduzidos a 20 °C e 120 rpm, em balões de 250 ml contendo 150 ml de meio, com um inóculo de  $4,0 \times 10^6$  cel/ml.

Os resultados obtidos mostram que a adaptação prévia ao etanol melhorou o desempenho da levedura no consumo de frutose. Esta melhoria no desempenho de células adaptadas poderá estar relacionada com o aumento da tolerância das células ao etanol devido à exposição prévia a concentrações subletais (Piper, 1995; Watson and Cavicchioli, 1983).

O melhor desempenho no consumo de glucose obtida pelas células em fase estacionária, segundo dados da literatura, poderá estar relacionada com as características exibidas nesta fase de crescimento. A fase estacionária é considerada uma resposta ao stresse ambiental, nomeadamente ausência de fonte de carbono e outros nutrientes. Esta resposta ao stresse é caracterizada pela acumulação de solutos compatíveis, como trealose e glicogénio, e indução da síntese de proteínas de choque térmico (Werner-Washburne *et al.*, 1993). Rossignol *et al.*, 2003, demonstraram que numa fermentação alcoólica, a acumulação de trealose e expressão de genes envolvidos na resposta ao stresse térmico atingiram o seu pico na entrada e durante a fase estacionária. Do mesmo modo, em estudos com stresse etanólico induzido em *S. cerevisiae*, verificou-se que a maioria dos genes induzidos

pertencem aos genes da resposta ao stresse ambiental, nomeadamente genes envolvidos na síntese de trealose e de proteínas de choque térmico (Alexandre *et al.*, 2001). O efeito protector da trealose sobre a integridade de membranas e estabilidade de proteínas (Hounsa *et al.*, 1998), está correlacionado com a maior resistência ao etanol (Lucero *et al.*, 2000). Assim, as células em fase estacionária e previamente adaptadas ao etanol desencadeiam uma resposta adaptativa ao stresse a que são sujeitas, o que as torna mais resistentes ao etanol do que as células em fase exponencial. Como consequência, a sua performance fermentativa é menos afectada pelo etanol.

Na tentativa de otimizar a eficiência da adaptação, foram testadas várias concentrações de etanol durante a adaptação e diferentes tempos, em meio com ou sem glucose e utilizando células em fase exponencial e estacionária de crescimento.

As experiências efectuadas demonstraram que o aumento da concentração de etanol acima de 10% (v/v) durante a adaptação de células em fase exponencial de crescimento, parece ter efeito inibitório pois as células adaptadas a 12 e 14% (v/v) de etanol não concluíram o consumo de frutose nos 8 dias do ensaio (Tabela 4.1). Também a adaptação em 10% (v/v) de etanol das células em fase estacionária parece ser inibitória não tendo estas concluído o consumo de frutose.

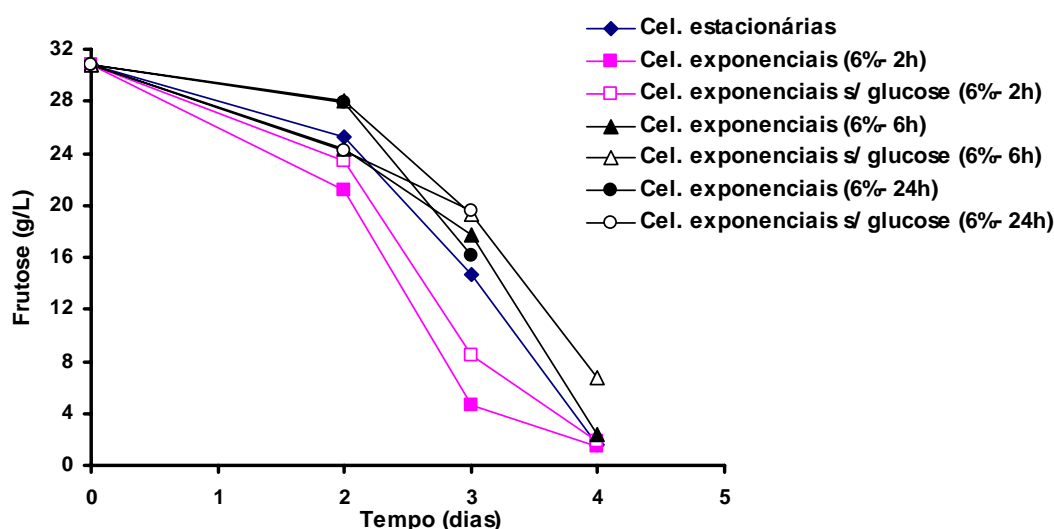
**Tabela 4.1** – Tempo médio de consumo de frutose pela estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792, em diferentes fases de crescimento e adaptadas em meio YPD contendo glucose e concentrações crescentes de etanol, durante 2 horas.

Fase de crescimento	Tempo médio de consumo de frutose (dias), 20°C
Estacionária	7
Estacionária + Adap. 10% (v/v) etanol	Sem consumo *
Exponencial	Sem consumo *
Exponencial + Adap. 6% (v/v) etanol	7
Exponencial + Adap. 10% (v/v) etanol	7
Exponencial + Adap. 12% (v/v) etanol	Sem consumo *
Exponencial + Adap. 14% (v/v) etanol	Sem consumo *

\* sem consumo completo ao fim de 8 dias



O aumento do tempo de adaptação ao etanol parece não melhorar o desempenho das células em fase exponencial, obtendo-se melhores resultados para uma adaptação de 2 horas (Figura 4.4). A adaptação feita em meio com ou sem glucose só apresenta diferenças a partir das 6 horas de adaptação, sendo o desempenho das células prejudicado com a ausência de glucose. Tendo como referência as células de fase estacionária, não se observaram melhorias significativas com o aumento de tempo de adaptação ou com a remoção da glucose do meio de adaptação.



**Figura 4.4** – Consumo de frutose pela estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792 em diferentes fases de crescimento (exponencial e estacionária) e adaptada em meio YP com ou sem glucose + 6% (v/v) de etanol durante 2, 6 e 24 horas. Os ensaios foram conduzidos a 20 °C e 120 rpm, em balões de 250 ml contendo 150 ml de meio, com um inóculo de  $4,0 \times 10^6$  cel/ml, em “mosto amuado simulado” contendo frutose (2,5%, p/v), extracto de levedura (1%, p/v), peptona (2%, p/v), etanol (12%, v/v) e ácido acético (0,06%, v/v), a pH 3,7.



---

*Capítulo 5*

**Avaliação da influência do transporte membranar de  
açúcares no perfil de fermentação**

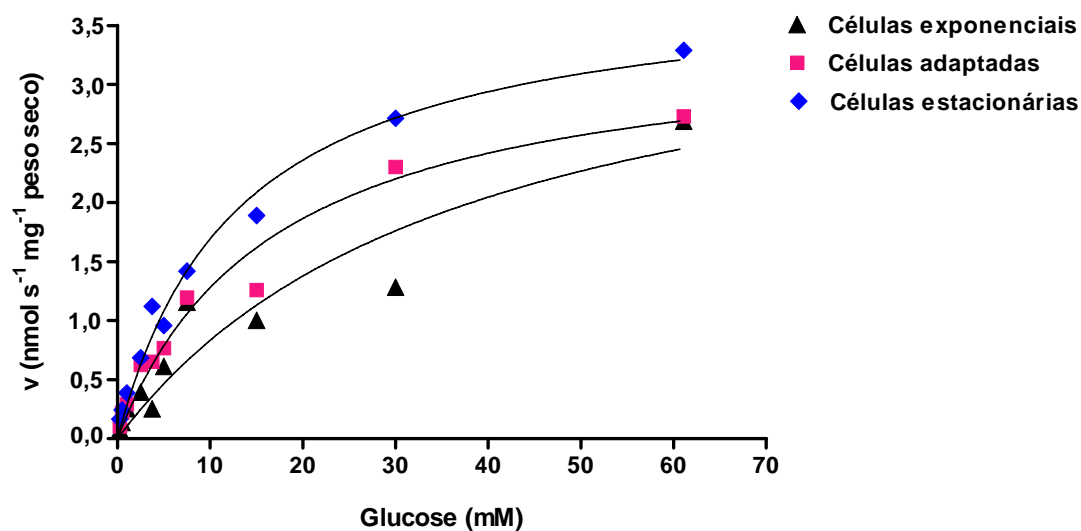
---

## 5.1 Caracterização do transporte membranar de glucose em *S. cerevisiae*.

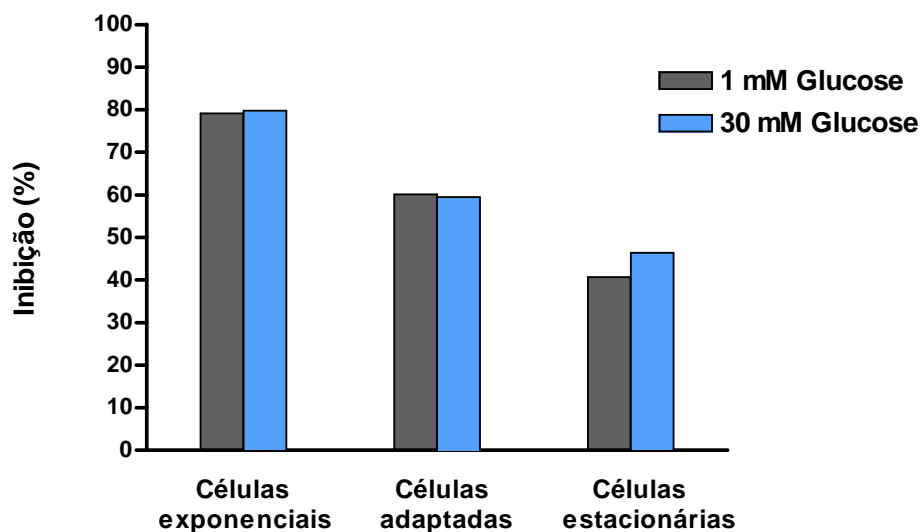
Na primeira fase destes estudos, avaliou-se o transporte membranar de glucose na estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792 a qual se mostrou mais eficiente nos ensaios de consumo de açúcar realizados anteriormente. A capacidade de transporte do açúcar foi avaliada na presença e na ausência de etanol, e utilizando células nas fases de crescimento e condições de adaptação que foram utilizadas nos ensaios de consumo de frutose, designadamente:

- células exponenciais: células provenientes de culturas em fase exponencial de crescimento;
- células adaptadas: células provenientes de culturas em fase exponencial de crescimento adaptadas durante duas horas em meio YPD com etanol 6% (v/v);
- células estacionárias: células provenientes de culturas em fase estacionária de crescimento.

De acordo com os resultados obtidos, os valores mais elevados para as velocidades iniciais de transporte de glucose foram observados em células estacionárias, seguidas de células adaptadas e células exponenciais, apresentando, as últimas, os valores mais baixos (Figura 5.1). Em presença de etanol (12%, v/v), o transporte de glucose foi extremamente afectado em células na fase exponencial de crescimento, com uma inibição de aproximadamente 80% (Figura 5.2). Este efeito foi menos acentuado quer em células adaptadas quer em células estacionárias, com inibições que rodam os 60 e 50%, respectivamente.



**Figura 5.1** – Velocidades iniciais de entrada de  $[U-^{14}C]$  glucose em função da concentração de glucose em células de *S. cerevisiae* PYCC 5792 provenientes de culturas em fase exponencial, em fase estacionária e adaptadas (em fase exponencial de crescimento) durante duas horas em meio YPD contendo etanol 6% (v/v).



**Figura 5.2** – Percentagem de inibição do transporte de glucose na presença de 12% (v/v) etanol em células de *S. cerevisiae* PYCC 5792 provenientes de culturas em fase exponencial, em fase estacionária e adaptadas (em fase exponencial de crescimento) durante duas horas em meio YPD contendo etanol 6% (v/v).

A maior capacidade de transporte de glucose apresentada pelas células em fase estacionária, está de acordo com a maior capacidade fermentativa demonstrada por estas células, na presença de etanol.

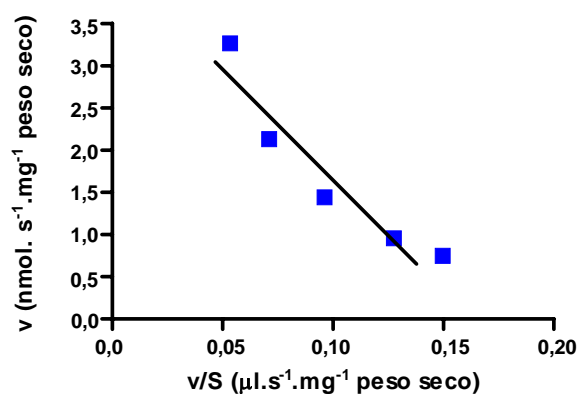
Contudo, os resultados obtidos para a inibição do transporte de glucose na presença de 12% (v/v) de etanol para as células em fase estacionária e para as células previamente adaptadas ao etanol, não se correlacionam directamente com a capacidade de consumo de frutose exibida por estas células na presença de 12% (v/v) de etanol. Estes dados sugerem, que nestas células, outros factores influenciam o consumo de açúcar.

Por outro lado, para as células exponenciais, os baixos consumos de frutose observados na presença de etanol, estão relacionados com as menores velocidades de transporte de açúcar e elevada inibição do transporte pelo etanol.

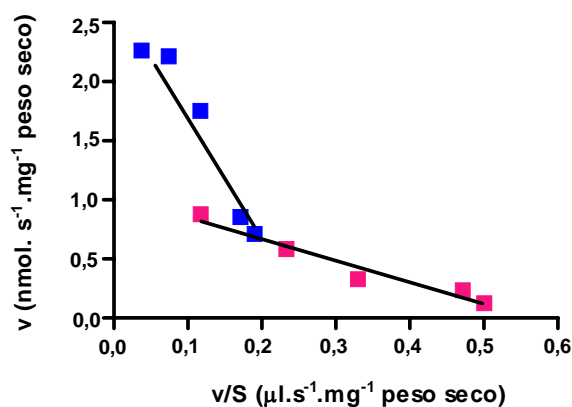
## **5.2 Efeito do etanol no transporte membranar de glucose em estirpes de *S. cerevisiae* que expressam unicamente um dos genes *HXT1-HXT7***

De acordo com os resultados acima apresentados o transporte de glucose em *S. cerevisiae*, apresentou diferentes sensibilidades em presença de etanol, em células provenientes de fase exponencial de crescimento ou de fase estacionária. Na literatura está descrito que o transporte de glucose em células provenientes destas duas fases de crescimento é assegurado maioritariamente por transportadores de glucose diferentes. Assim, no sentido de averiguar se as diferenças de sensibilidade do transporte de glucose ao etanol encontradas, poderiam estar relacionadas com a expressão de diferentes transportadores foi estudada a inibição do transporte de glucose pelo etanol em estirpes de *S. cerevisiae* que expressam unicamente um dos transportadores de glucose com relevância fisiológica (*Hxt1-Hxt7*) (Reiferberger *et al.*, 1997).

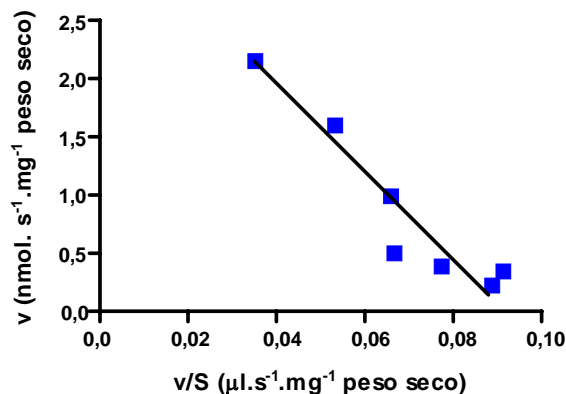
Para tal, foi inicialmente caracterizada a cinética de transporte de glucose em cada um dos mutantes na ausência de etanol (Figura 5.4 a 5.10) e seguidamente foi determinada a inibição do transporte de glucose em presença do álcool (Tabela 5.1).



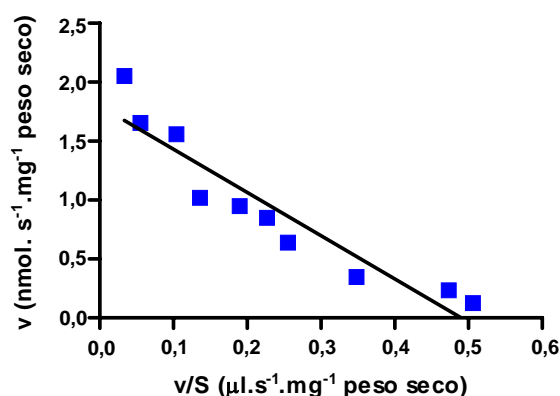
**Figura 5.4** – Velocidades iniciais de entrada de [U-<sup>14</sup>C] glucose em função da concentração de glucose em células de *S. cerevisiae* RE601A (expressando unicamente *HXT1*) provenientes de culturas em fase exponencial de crescimento.



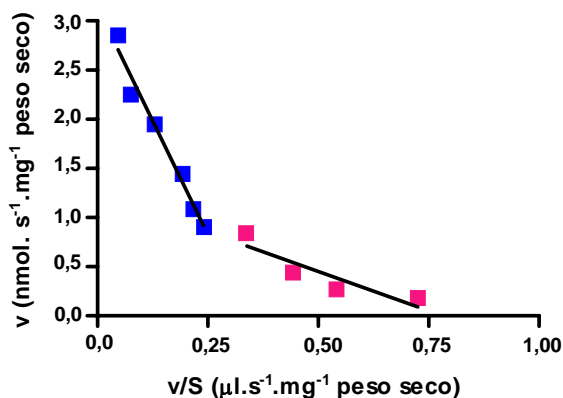
**Figura 5.5** – Velocidades iniciais de entrada de [U-<sup>14</sup>C] glucose em função da concentração de glucose em células de *S. cerevisiae* RE602B (expressando unicamente *HXT2*) provenientes de culturas em fase exponencial de crescimento.



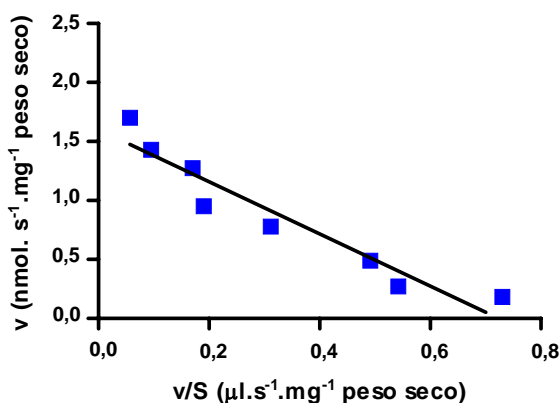
**Figura 5.6** – Velocidades iniciais de entrada de [U-<sup>14</sup>C] glucose em função da concentração de glucose em células de *S. cerevisiae* RE603A (expressando unicamente *HXT3*) provenientes de culturas em fase exponencial de crescimento.



**Figura 5.7** – Velocidades iniciais de entrada de [U-<sup>14</sup>C] glucose em função da concentração de glucose em células de *S. cerevisiae* RE604A (expressando unicamente *HXT4*) provenientes de culturas em fase exponencial de crescimento.

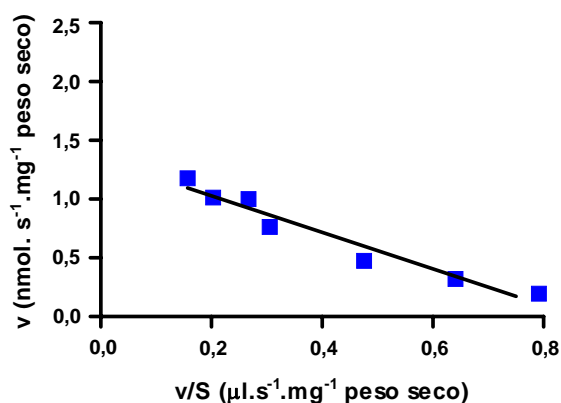


**Figura 5.8** – Velocidades iniciais de entrada de [U-<sup>14</sup>C] glucose em função da concentração de glucose em células de *S. cerevisiae* RE605 (expressando unicamente *HXT5*) provenientes de culturas em fase exponencial de crescimento.



**Figura 5.9** – Velocidades iniciais de entrada de [U-<sup>14</sup>C] glucose em função da concentração de glucose em células de *S. cerevisiae* RE606A (expressando unicamente *HXT6*) provenientes de culturas em fase exponencial de crescimento.





**Figura 5.10** – Velocidades iniciais de entrada de [U-<sup>14</sup>C] glucose em função da concentração de glucose em células de *S. cerevisiae* RE607A (expressando unicamente *HXT7*) provenientes de culturas em fase exponencial de crescimento.

**Tabela 5.1** – Percentagem de inibição das velocidades iniciais de transporte de glucose em presença de 12% (v/v) de etanol em diferentes estirpes de *S. cerevisiae*, em fase de crescimento exponencial e estacionária.

Estirpe	% inibição ± desvio padrão			
	Exponencial		Estacionária	
	1 mM Glu	30 mM Glu	1 mM Glu	30 mM Glu
<b>RE601A</b>	52,52±3,78	34,77±15,16	57,14 ± 12,04	2,55 ± 11,70
<b>RE602B</b>	67,07±2,66	68,19±6,46	63,91 ± 4,82	69,91 ± 9,83
<b>RE603A</b>	50,70±11,28	61,30±4,16	45,76 ± 30,40	68,62 ± 9,42
<b>RE604A</b>	79,10±4,15	71,77±3,91	46,20 ± 7,19	41,46 ± 10,36
<b>RE605</b>	74,08±2,20	67,52±3,74	48,50 ± 3,92	24,83 ± 7,18
<b>RE606A</b>	69,16±2,22	68,60±4,60	73,68 ± 3,60	55,53 ± 5,79
<b>RE607A</b>	73,80±3,71	75,67±5,80	63,33 ± 2,54	55,72 ± 9,65

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.1, verifica-se que os transportadores de glucose apresentam diferentes percentagens de inibição do transporte na

presença de etanol. Os mutantes que expressam transportadores de glucose de alta afinidade (mutantes RE606A e RE607A) são os mais sensíveis à inibição do transporte de glucose na presença de etanol. O mutante RE602B, que expressa um transportador de alta/média afinidade, foi também bastante inibido. Em contrapartida, os efeitos inibitórios do etanol foram menos pronunciados nos mutantes RE601A e RE603A, que expressam transportadores de glucose de baixa afinidade. Os mutantes RE604A e RE605 demonstraram diferentes graus de inibição em presença de etanol consoante a fase de crescimento, apresentando uma menor inibição na fase estacionária. Para os restantes transportadores não houve uma variação significativa do grau de inibição com a fase de crescimento, parecendo indicar que a diferença na composição lipídica da membrana, que será de esperar nesta transição de fases, não afecta significativamente a actividade destes transportadores.

De acordo com a literatura (Reifenberger *et al.*, 1997; Luyten *et al.*, 2002) os diferentes transportadores de glucose apresentam padrões de expressão diversos ao longo de uma curva de crescimento. Assim, os transportadores Hxt1 e Hxt2 são expressos principalmente no início da fermentação, *HXT3* será o gene mais expresso durante a fase exponencial de crescimento, sendo os transportadores Hxt6 e Hxt7 os responsáveis pela finalização da fermentação. O transportador Hxt5 parece não ter um papel importante em condições de fermentação normais quer em meios de laboratório quer em mosto sintético. Por outro lado, a expressão do transportador Hxt4, em mosto sintético, parece aumentar com a fase exponencial de crescimento, decrescendo rapidamente em fase estacionária.

Considerando os dados disponíveis na literatura sobre a expressão diferencial dos transportadores de glucose ao longo da curva de crescimento em estirpes laboratoriais (Reifenberger *et al.*, 1997; Luyten *et al.*, 2002), a inibição do transporte de glucose pelo etanol observada quando os transportadores de glucose são expressos individualmente, parece não justificar na totalidade as diferenças de inibição do transporte de açúcar encontradas nas diferentes fases de crescimento da estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792. De facto o transporte de glucose na estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792 foi muito sensível na fase exponencial de crescimento, não estando de acordo com o papel predominante do transportador Hxt3 nesta fase de crescimento referido na literatura. Por outro lado, os transportadores que apresentaram maior sensibilidade ao etanol foram o Hxt6 e o Hxt7, que se espera terem um papel predominante na fase estacionária, onde se verificou uma menor inibição na estirpe

*S. cerevisiae* PYCC 5792. Apenas para os mutantes RE604 e 605, foi verificada uma menor inibição de transporte na presença de etanol na fase estacionária. Dados da literatura sobre a regulação da expressão do transportador Hxt4 são algo contraditórios (Diderich *et al.*, 1999), contudo, num estudo levado a cabo sob condições enológicas, este transportador foi expresso durante a fase exponencial de crescimento, na presença de concentrações elevadas de glucose (Perez *et al.*, 2004). A elevada inibição de transporte demonstrada pelo mutante RE604 na presença de etanol, na fase exponencial de crescimento, poderá relacionar-se com a elevada inibição de transporte demonstrada pela estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792 nesta mesma fase, sugerindo um papel importante deste transportador na fase exponencial de crescimento. A menor inibição do transporte, na presença de etanol, demonstrada por células em fase estacionária da estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792, poderá estar relacionada com a menor inibição do transporte apresentada pelo mutante RE605 para esta mesma fase. Estudos comprovam que o gene *HXT5* é induzido em condições de stresse (esfomeamento da fonte de carbono e azoto) (Buziol *et al.*, 2002) e a sua expressão é induzida simultaneamente com a de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos de reserva (Verwaal *et al.*, 2002).

A falta de correlação encontrada poderá ainda dever-se ao facto de os transportadores de hexoses provenientes de estirpes enológicas e laboratoriais poderem apresentar um comportamento dissimilar numa fermentação enológica, apesar de possuírem sequências de elevada homologia (Varela *et al.*, 2005). Em estudos efectuados com uma estirpe vínica, onde se analisou os níveis de expressão dos diferentes transportadores durante uma fermentação, verificou-se que os transportadores Hxt6 e Hxt7 começaram a ser expressos no início da fase estacionária, na presença de concentrações anteriormente consideradas repressoras (Perez *et al.*, 2004).

---

*Capítulo 6*

**Considerações finais**

---



## Considerações finais

Na primeira fase deste trabalho as estirpes em estudo foram caracterizadas no que respeita à sua dependência da concentração de fonte de azoto no meio de cultura, e ao seu perfil de resposta à presença de etanol e ácido acético. Da avaliação da resposta das estirpes em estudo, quanto à concentração da fonte de azoto, pode-se concluir que a concentração mínima requerida por estas estirpes para o esgotamento total de açúcar presente no meio, num tempo considerado normal, é de 267 mg/L de azoto assimilável. Concentrações abaixo deste valor aumentam o tempo necessário ao esgotamento total de açúcares, conduzindo a fermentações amuadas. Esta concentração mínima requerida pelas estirpes em análise está de acordo com resultados da literatura obtidos para outras estirpes (Mendes-Ferreira *et al.*, 2004). Por outro lado, não foram encontradas diferenças muito significativas entre as estirpes estudadas no que diz respeito às suas necessidades de azoto.

A análise da viabilidade celular em presença de etanol e ácido acético e da capacidade fermentativa nas mesmas condições permite concluir que as estirpes comerciais de *S. cerevisiae* são as mais eficientes na remoção de frutose de um “mosto amuado simulado”, mostrando que não existe uma correlação directa entre perda de viabilidade na presença de etanol e ácido acético e a capacidade de fermentar frutose na presença destes agentes de stresse.

A estirpe *S. cerevisiae* PYCC 5792 demonstrou ser a melhor no consumo de frutose em presença de etanol e ácido acético. As experiências de adaptação demonstraram que uma adaptação prévia a concentrações moderadas de etanol, durante 2 horas, melhora o consumo de frutose, de células desta estirpe em fase exponencial. Foi também observada, para células em fase exponencial, uma correlação entre consumo de frutose e transporte de glucose na presença e ausência de etanol. Os baixos consumos de frutose observados estão provavelmente relacionados com os baixos valores de velocidades iniciais de transporte de açúcar, bem como com a elevada inibição deste transporte pelo etanol. Por outro lado, quando se compara células em fase estacionária e em fase exponencial previamente adaptadas a etanol, as diferenças observadas para o transporte de glucose na presença ou ausência de etanol, não se reflectem nas taxas de consumo de frutose, sugerindo que nestas células outros factores influenciam o consumo de açúcar.

Em ensaios de viabilidade celular a estirpe *T. delbrueckii* PYCC 5323 apresentou uma elevada resistência ao etanol. Esta tolerância poderá estar relacionada com a elevada resistência demonstrada por esta estirpe a outros tipos de stresse, nomeadamente osmótico e ao congelamento (Alves-Araújo *et al.*, 2004; Hernandez-Lopez *et al.*, 2003). Por outro lado, a capacidade fermentativa exibida por esta estirpe, na presença de 12% (v/v) de etanol foi bastante reduzida o que se poderá dever às condições de limitação de oxigénio em que decorreram os ensaios, uma vez que esta estirpe apresenta necessidades em oxigénio superiores às exibidas por *S. cerevisiae* (Hansen *et al.*, 2001; Hanl *et al.*, 2005), mas também ao efeito inibitório do etanol no transporte de glucose, verificado durante este trabalho.

---

## **Bibliografia**

---





## Bibliografia

**Alexandre, H.; Ansanay-Galeote, V.; Dequin, S.; Blondin B.** (2001) Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 498: 98-103.

**Alexandre, H.; Charpentier, C.** (1998) Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. J. Ind. Microbiol. 20: 20-27.

**Alexandre, H.; Rousseaux, I.; Charpentier, C.** (1994) Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. FEMS Microbiol. Lett. 124: 17-22.

**Alves-Araújo, C.; Almeida, M.J.; Sousa, M.J.; Leão, C.** (2004) Freeze tolerance of yeast *Torulaspora delbrueckii*: celular and biochemical basis. FEMS Microbiol. Lett. 240: 7-14.

**Beltran, G.; Esteve-Zarzoso, B.; Rozes, N.; Mas, A.; Guillamón, J.M.** (2005) Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. J. Agric. Food Chem. 53: 996-1002.

**Bisson, L.F.** (1999) Stuck and sluggish fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 50: 107-119.

**Bisson, L.F.** (2004) The Biotechnology of Wine Yeast. Food Biotechnology 18: 63-96.

**Bisson, L.F.; Butzke, C.E.** (2000) Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 51: 168-177.

**Bisson, L.F.; Kunec, R.E.** (1993) Wine-making yeasts, In A.H. Rose and J.S. Harrison, The Yeasts, vol 5, 2<sup>nd</sup> edition p. 69-118. Academic Press Inc. San Diego.

**Bisson, L. F.; Waterhouse, A.L.; Ebeler, S.E.; Walker, M.A.; Lapsley, J.T.** (2002) The present and future of the international wine industry. Nature, 418: 696-699.

**Buziol, S.; Becker, J.; Baumeister, A.; Jung, S.; Mauch, K.; Reuss, M.; Boles, E.** (2002) Determination of in vivo kinetics of the starvation-induced Hxt5 glucose transport of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS 2: 283-291.

**Cardoso, H.; Leão, C.** (1992) Mechanisms underlying the low and high enthalpy death induced by short-chain monocarboxylic acids and ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol, 38: 388-392.

**Carrasco, P.; Perez-Ortin, J.E.; Olmo, M.** (2003) Arginase activity is a useful marker of nitrogen limitation during alcoholic fermentations. System. Appl. Microbiol. 26: 471-479.

**Cartwright, C.P.; Juroszek, J-R.; Beavan, M.J.; Ruby, F.M.S.; Morais, S.M.F.; Rose, A.H.** (1986) Ethanol Dissipates the Proton-motive Force across the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 132: 369-377.

**Casal, M.; Cardoso, H.; Leão, C.** (1998) Effects of ethanol and other alkanols on transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 665-668.

**Cavaliere, D.; Townsend, J.P.; Hartl, D.L.** (2000) Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. PNAS 97: 12369-12374.

**Ciani, M.; Maccarelli, F.** (1998) Oenological properties of non- *Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. World J. Microbiol. Biotechnol. 14: 199-203.

**Costa, V.; Amorim, M.A.; Reis, E.; Quintanilha, A.; Moradas-Ferreira, P.** (1997) Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic-phase. Microbiol. 143: 1649-1656.

**Diderich, J.A.; Schepper, M.; van Hoek, P.; Luttik, M.A.H.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T.; Klaassen, P.; Boelens, H.F.M.; Teixeira de Matos, M.J.; van Dam, K.; Kruckeberg, A.L.** (1999) Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 274: 15350-15359.

**Donèche, B.J.** (1993) Botrytized Wines. In *Wine Microbiology and Biotechnology* ed Fleet, G.H. pp 77-163 Switzerland: Harwood Academic Publishers.

**Edwards, C.G.; Reynolds, A.G.; Rodriguez, A.V.; Semon, M.J.; Milss, J.M.** (1999) Implication of Acetic Acid in the Induction of Slow/Stuck Grape Juice Fermentations and Inhibition of Yeast by *Lactobacillus* sp. Am. J. Enol. Vitic 50: 204-210.

**Elbing, K.; Larsson, C.; Bill, R.M.; Albers, E.; Snoep, J.L.; Boles, E.; Hohmann, S.; Gustafsson, L.** (2004) Role of Hexose Transport in Control of Glycolytic Flux in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 5323-5330.

**Esteve-Zarzoso, B.; Manzanares, P.; Ramón, D.; Querol, A.** (1998) The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. Internatl. Microbiol. 1: 143-148.

**Esteve-Zarzoso, B.; Gostincar, A.; Bobet, R.; Uruburu, F.; Querol, A.** (2000) Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the "El Penedès" area (Spain). Food Microbiol. 17: 553-562.

**Fernandes, L.; Corte-Real, M.; Leão, C.** (1999) A peculiar behaviour for cell death induced by weak carboxylic acids in the wine spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. Lett. Appl. Microbiol. 28: 345.

**Gancedo, C.; Serrano, R.** (1989) Energy-Yielding Metabolism In: The Yeasts, vol 3, 2<sup>nd</sup> edition, pp. 205-359, Rose, A.H. e Harrison, J.S., Academic Press, London.

**Guldfeldt, L.U.; Arneborg, N.** (1998) Measurement of the effects of Acetic Acid and Extracellular pH on Intracellular pH of Nonfermenting, Individual *Saccharomyces cerevisiae* cells by Fluorescence Microscopy. Appl. Environ. Microbiol. 64: 530-534.

**Hanl, L.; Sommer, P.; Arneborg, N.** (2005) The effect of decreasing oxygen feed rates on growth and metabolism of *Torulaspora delbrueckii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67: 113-118.

**Hansen, E. H.; Nissen, P.; Sommer, P.; Nielsen, J.C.; Arneborg, N.** (2001) The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. J. Appl. Microbiol. 91: 541-547.

**Henschke, P.A.; Jinanek, V.** (1993) Yeasts - Metabolism of Nitrogen Compounds. In *Wine Microbiology and Biotechnology* ed Fleet, G.H. pp 77-163 Switzerland: Harwood Academic Publishers.

**Hernandez-Lopez, M.J.; Prieto, J.A.; Randez-Gil, F.** (2003) Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 125-134.

**Hinze, H.; Holzer, H.** (1986) Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Arch. Microbiol.* 145: 27-31.

**Hounsa, C-G.; Brandt, E.V.; Thevelein, J; Hohmann, S.; Prior, B.A.** (1998) Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiol.* 144: 671-680.

**Johnston, J.R.; Baccari, C.; Mortimer, R.K.** (2000) Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. *Res. Microbiol.* 151: 583-590.

**Leão, C.; van Uden, N.** (1982) Effects of ethanol and other alkanols on the kinetics and the activation parameters of thermal death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 1581-1590.

**Leão, C.; van Uden, N.** (1983a) Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 2601-2604.

**Leão, C.; van Uden, N.** (1983b) Effects of ethanol and other alkanols on the ammonium transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2085-2090.

**Leão, C.; van Uden, N.** (1984a) Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta* 774: 43-48.

**Leão, C.; van Uden, N.** (1984b) Effects of ethanol and other alkanols on the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 403-405.

**Leão, C.; van Uden, N.** (1985) Effects of ethanol and other alkanols on temperature relations of glucose transport and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 22: 359-363.

**Loureiro-Dias, M.C.; Santos, H.** (1990) Effects of ethanol on *Saccharomyces cerevisiae* as monitored by in vivo <sup>31</sup>P and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. *Arch Microbiol.* 153: 384-91.

**Lucero, P.; Peñalver, E.; Moreno, E.; Lagunas, R.** (2000) Internal Trehalose Protects Endocytosis from Inhibition by Ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4456-4461.

**Ludovico, P.; Rodrigues, F.; Almeida, A.; Silva, M.T.; Barrientos, A.; Côte-Real, M.** (2002) Cytochrome c release and Mitochondria involvement in Programmed Cell Death induced by Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 13: 2598-2606.

**Ludovico, P.; Sousa, M.J.; Silva, M.T.; Leão, C.; Corte-Real, M.** (2001) *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiol.* 147: 2409-2415.

- Luyten, K.; Riou, C.; Blondin, B.** (2002) The hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* play different roles during enological fermentation. *Yeast* 19: 713-726.
- Maurício, J.C.; Millán, C.; Ortega, J.M.** (1998) Influence of oxygen on the biosynthesis of cellular fatty acids, sterols and phospholipids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 405-410.
- Medina, K.; Carrau, F.M.; Gioia, O.; Bracesco, N.** (1997) Nitrogen Availability of Grape Juice Limits Killer Yeast Growth and Fermentation Activity during Mixed-Culture Fermentations with Sensitive Commercial Yeast Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2821-2825.
- Mendes-Ferreira, A.; Mendes-Faia, A.; Leão, C.** (2004) Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *J. Appl. Microbiol.* 97: 540-545.
- Mills, D.A.; Johannsen, E.A.; Cocolin, L.** (2002) Yeast Diversity and Persistence in Botrytis-Affected Wine Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4884-4893.
- Mortimer, R.; Polsinelli, M.** (1999) On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150: 199-204.
- Ozcan, S.; Johnston, M.** (1999) Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 554-569.
- Pampulha, M.E. e Loureiro, V.** (1989) Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 11: 269-274.
- Pampulha, M.E. e Loureiro-Dias, M. C.** (1989) Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 547-550.
- Pampulha, M.E. e Loureiro-Dias, M. C.** (1990) Activity of glycolytic enzymes of *S. cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34: 375-380.
- Perez, M.; Luyten, K.; Michel, R.; Riou, C.; Blondin, B.** (2004) Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *FEMS* 351-361.
- Pina, C.; António, J.; Hogg, T.** (2004a) Inferring ethanol tolerance of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts by progressive inactivation. *Biotechnol. Lett.* 26: 1521-1527.
- Pina, C.; Santos, C.; Couto, J.A.; Hogg, T.** (2004b) Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* – influence of different culture conditions. *Food Microbiol.* 21: 439-447.
- Piper, P.W.** (1995) The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.* 134: 121-127.
- Pretorius, I.S.** (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.
- Puig, S.; Querol, A.; Barrio, E.; Perez-Ortin, J.E.** (2000) Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2057-2061.

- Quintas, C.; Lima-Costa, E.; Loureiro-Dias, M.C.** (2000) The Effect of Ethanol on the Plasma Membrane Permeability of Spoilage Yeasts. *Food Technol. Biotechnol.* 38: 47-51.
- Rainieri, S.; Pretorius, I.S.** (2000) Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol.* 50: 15-31.
- Rainieri, S.; Zambonelli, C.; Tini, V.; Castellari, L.; Giudici, P.** (1998b) The enological traits of thermotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 319-324.
- Ratledge, C.; Evans, C.T.** (1989) Lipids and their metabolism. *In: The Yeasts*, vol 3, 2<sup>nd</sup> edition, pp. 367-455, Rose, A.H. e Harrison, J.S., Academic Press, London.
- Reed, G.; Nagodawithana, T.W.** (1988) Technology of Yeast Usage in Winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 83-90.
- Reiferberger, E.; Boles, E.; Ciriacy, M.** (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* 245: 324-333.
- Remize, F.; Andriu, E.; Dequin, S.** (2000) Engineering of the Pyruvate Dehydrogenase Bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the cytosolic  $Mg^{2+}$  and Mitochondrial  $K^{+}$  Acetaldehyde Dehydrogenases Ald6p and Ald4p in Acetate Formation during Alcoholic Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3151-3159.
- Ribeiro, I.C.; Veríssimo, I.; Moniz, L.; Cardoso, H.; Sousa, M.J.; Soares, A.M.V.M.; Leão, C.** (2000) Yeasts as a model for assessing the toxicity of the fungicides Penconazol, Cymoxanil and Dichlofluanid. *Chemosphere* 41: 1637-1642.
- Rodrigues, F.; Corte-Real, M.; Leão, C.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T.** (2001) Oxygen Requirements of the Food Spoilage Yeast *Zygosaccharomyces bailii* in Synthetic and Complex Media. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2123-2128.
- Rosa, M.F.; Sa-Correia, I.** (1991) In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 830-5.
- Rosa, M.F.; Sa-Correia, I.** (1996) Intracellular acidification does not account for inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of ethanol. *FEMS Microbiol Lett.* 135: 271-274.
- Rossignol, T.; Dulau, L.; Julien, A.; Blondin, B.** (2003) Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast* 20: 1369-1385
- Sá-Correia, I.; van Uden, N.** (1983) Temperature profiles of ethanol tolerance: effects of ethanol on the minimum and maximum temperatures for growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 1665-1667.
- Salmon, J.M.** (1989) Effect of Sugar Transport Inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on Sluggish and Stuck Enological Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 953-958.
- Schuller, D.; Casal, M.** (2005) The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 292-304.
- Scopes, R.K.** (1989) Effects of ethanol on glycolytic enzymes. *In Alcohol toxicity in yeast and bacteria*, pp. 89-107, van Uden, N. (Ed.), MD, CRC Press, Inc., Florida.

**Sommer, P.; Stolpe, E.; Kramp, B.; Heinemeyer, J.** (2003) Dried Starter Cultures of Non-*Saccharomyces* Yeasts for Alcoholic Fermentation: Impact of *Kluyveromyces thermotolerans* or *Torulaspora delbrueckii* with *Saccharomyces cerevisiae* on Aroma and Flavor Development in Wine. ASEV 54th Annual Meeting pp. 83.

**Sousa-Dias, S.; Golçalves, T.; Leyva, J.S.; Peinado, J.M.; Loureiro-Dias, M.C.** (1996) Kinetics and regulation of fructose and glucose transport systems are responsible for fructophily in *Zygosaccharomyces bailii*. Microbiol. 142: 1733-1738.

**Sousa, M.J.; Miranda, L.; Corte-Real, M.; Leão, C.** (1996) Transport of acetic acid in *Zygosaccharomyces bailii*: effects of ethanol and their implications on the resistance of the yeast to acidic environments. Appl. Environ. Microbiol., 62: 3152-3157.

**Sousa, M.J.; Teixeira, J.A.; Mota, M.** (1991) Malo-alcoholic fermentation: the influence of operating conditions on the kinetics of deacidification. Journal of Wine Research, 2: 115-124.

**Sousa, M.J.; Teixeira, J.A.; Mota, M.** (1993) Must deacidification with na induced flocculant yeast strain of *S. pombe*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 189-193.

**Specht, G.** (2003) Overcoming stuck and sluggish fermentations. Pratical Winery & Vineyard

**Taillandier, P.; Riba, J.P. ; Strehaiano, P.** (1988b) Malate utilization by *S. pombe*. Biotechnol. Lett. 10: 469-472.

**van Uden, N.** (1984a) Temperature profiles of yeasts. Advances in Microbiol. Physiology 25: 195-251.

**van Uden, N.** (1984b) Cardinal temperatures of yeasts. CRC Critical Rev. Biotechnol. 6: 1-8.

**van Uden, N.; Madeira-Lopes, A.** (1970) Concurrent exponential growth and death of cell population of *Saccharomyces cerevisiae* at superoptimal temperatures. Z. Allg. Mikrobiol. 10: 515-526.

**van Uden, N.; Vidal-Leiria, M.M.** (1976) Thermodynamic compensation in microbial thermal death. Studies with yeasts. Archiv. Microbiol. 108: 293-298.

**van Uden, N.; Abranches, P.; Cabeça-Silva, C.** (1986) Temperature functions of thermal death in yeasts and their relation to the maximum temperature for growth. Archiv. Microbiol. 61: 381-393.

**Varela, C.; Cárdenas, J.; Melo, F.; Agosin, E.** (2005) Quantitative analysis of wine yeast gene expression profiles under winemaking conditions. Yeast, 22: 369-383.

**Verwaal, R.; Paalman, J.W.G.; Hogenkamp, A.; Verkleij, A.J.; Verrips, C.T.; Boonstra J.** (2002) *HXT5* expression is determined by growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 19: 1029-1038.

**Viegas, C.A.; Rosa, M.F.; Sá-Correia, I.; Novais, J.M.** (1989) Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanol fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 55: 21-28.

**Watson, K.; Cavicchioli, R.** (1983) Acquisition of ethanol tolerance in yeast cells by heat shock. Biotechnol. Lett. 5: 683-688.

**Werner-Washburne, M.; Braun, E.; Johnston, G. C.; Singer, R. A.** (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Ver. 57: 383-401

**Wissing, S.; Ludovico, P.; Herker, E.; Buttner, S.; Engelhardt, S.M.; Decker, T.; Link, A.; Proksch, A.; Rodrigues, F.; Corte-Real, M.; Frohlich, KU.; Manns, J.; Cande, C.; Sigrist, S.J.; Kroemer, G.; Madeo, F.** (2004) An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. J. Cell. Biol 166: 969-974.

**You, K.M.; Rosenfield, C-L.; Knipple, D.C.** (2003) Ethanol Toleranc in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1499-1503.



---

## **Anexo 1**

---

## Composição dos meios de cultura referidos na secção 2.2.1

**Tabela 1-** Meios de cultura

Meio de cultura – nível de azoto	Sulfato de amónia (g/L)
D1- 66 mg/L	0,310
D - 150 mg/L	0,705
D4 - 267 mg/L	1,260
D3 - 402,5 mg/L	1,900

**Tabela 2** – Composição dos meios de cultura (D1, D-150, D3 e D4), pH 3,7

Composição (para 1 litro)	
Glucose	200 g
Tartarato de potássio	5 g
Ácido L-málico	3 g
Ácido cítrico	0,2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,14 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,23 g
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0,44 g
Solução stock de vitaminas (10x)	100 ml
Solução stock de minerais (1000x)	1 ml
Sulfato de amónia	variável*

\* ver tabela 1

**Tabela 3** – Composição da solução de minerais

<b>Minerais</b>	<b>1000x</b>
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	198,2 mg
ZnCl <sub>2</sub>	135,5 mg
FeCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	50,1 mg
CuCl <sub>2</sub>	13,6 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,7 mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	29,1 mg
NaMoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	24,2 mg
KIO <sub>3</sub>	10,8 mg
Água	1000 ml

**Tabela 4** – Composição da solução de vitaminas

<b>Vitaminas</b>	<b>10x</b>
Myo-inositol	1000 mg
Piridoxina.HCl	20 mg
Ácido nicotínico	20 mg
Pantotenato de cálcio	10 mg
Tiamina.HCl	5 mg
Ácido p-aminobenzoico	2 mg
Riboflavina	2 mg
Biotina	1,25 mg
Ácido fólico	2 mg
Água	1000 ml

Este trabalho foi desenvolvido ao abrigo do projecto PARFERM – Paragens de Fermentação Alcoólicas: causas múltiplas e soluções integradas.

Responsável Científico: Cecília Leão

Promotor: Proenol – Indústria Biotecnológica Lda.

Parceiros: Universidade do Minho/ Departamento de Biologia  
Maria João Sousa  
Maria Helena Cardoso

Faculdade de Ciências e Tecnologia/ Universidade Nova de Lisboa  
Isabel Spencer – Martins